

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus dem Institut für Pharmakologie

**Interaktion der
G-Protein-Untereinheit $G\beta_3$
und ihrer Spleißvarianten
mit $G\gamma$ -Untereinheiten**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen**

Vorgelegt von

**Christiane Maria Nikula
aus Herford
2004**

Dekan : Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Rosskopf

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. E. Gulbins

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. W. A. Schulz, Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2005

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden publiziert oder auf medizinischen Kongressen präsentiert:

Rosskopf, D., Manthey, I., Habich, C., Kielbik, M., Eisenhardt, A., Nikula, C., Urban, M., Kohnen, S., Graf, E., Ravens, U., Siffert, W. (2003):

Identification and characterisation of G β 3s2, a novel splice variant of the G-protein β 3 subunit.

Biochem. J. 371, 223-232

Rosskopf, D., Nikula, C., Manthey, I., Joisten, M., Frey, U., Kohnen, S., Siffert, W. (2003):

The human G protein β 4 subunit: gene structure, expression, G γ and effector interaction.

FEBS Letters 544, 27-32

Vortrag auf der 42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie in Mainz:

Nikula, C., Bilmen, G., Siffert, W., Rosskopf, D. (2001):

Interaction of the G-protein splice variant G β 3s with G γ subunits.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. to Vol. 363, Nr. 4

Inhaltsverzeichnis

1.	Kurzfassung	8
2.	Einleitung	11
2.1.	Heterotrimere G-Proteine	11
2.1.1.	Rezeptoraktivierung und GTPase-Zyklus	12
2.1.2.	Familien der G-Proteine und ihre Effektoren	13
2.2.	Das Gβγ-Dimer	14
2.2.1.	Die G-Protein β-Untereinheit	14
2.2.2.	Die Gγ-Untereinheit	15
2.2.2.1.	Struktur und Funktion von Gγ-Proteinen	16
2.2.2.2.	Expression der verschiedenen Gγ-Isoformen	17
2.2.3.	Struktur der Gβγ-Untereinheit	18
2.3.	Der C825T-Polymorphismus in <i>GNB3</i> und die Gβ ₃ -Spleißvarianten Gβ _{3s} und Gβ _{3s2}	19
2.3.1.	Gβ _{3s} und Gβ _{3s2} , zwei neue Isoformen der Gβ ₃ -Untereinheit	19
2.3.2.	Alternatives Spleißen von <i>GNB3</i> in Assoziation mit dem C825T-Polymorphismus	21
2.4.	Physiologische und pathophysiologische Aspekte des <i>GNB3</i> C825T-Polymorphismus	23
2.5.	Methoden zur Untersuchung der Gβγ-Dimerbildung	24
3.	Material und Methoden	28
3.1.	Chemikalien	28
3.1.1.	Chemikalien und Feinchemikalien	28
3.1.2.	Radiochemikalien	28
3.1.3.	Medium, Serum und Antibiotikazusätze für die Zellkultur	29
3.1.4.	Medium, Serum und Zusätze für die metabolische Markierung	29
3.2.	Materialien für immunologische Untersuchungen	29
3.2.1.	Erstantikörper	29
3.2.2.	Zweitantikörper	29
3.3.	Konstrukte von G-Protein-Untereinheiten in pcDNA31 ⁺	30
3.4.	Materialien für Molekularbiologische Untersuchungen	31
3.4.1.	Materialien für die Bakterienkultur	31
3.4.2.	Kommerzielle Kits für molekularbiologische Arbeiten	31
3.4.3.	Molekulargewichtsstandards	31
3.4.4.	Enzyme	31
3.4.4.1.	Restriktionsenzyme	31
3.4.5.	Nukleotide	32
3.4.6.	Zugehörige Reaktionspuffer	32
3.4.7.	Vektoren	33
3.4.8.	Oligonukleotidprimer	34

3.4.8.1.	Primer aus der Sequenz des pGEM-T Easy-Vektors	34
3.4.8.2.	Primer aus der Sequenz des pcDNA31-Vektors	35
3.4.8.3.	Individuelle G γ -Primer	35
3.4.8.4.	Individuelle G β -Primer	36
3.5.	Filter- und Blotpapier	37
3.6.	Puffer, Lösungen und Medien	38
3.6.1.	Häufig verwendete Puffer- und Waschlösungen	38
3.6.2.	Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	38
3.6.3.	Medien für die Zellkultur	38
3.6.4.	Puffer zur Herstellung von Zelllysaten	39
3.6.5.	Radio-Immuno-Precipitation-Assay- (RIPA-)Puffer	40
3.6.6.	Lösungen und Puffer für die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen und den Elektrotransfer	40
3.6.7.	Lösungen für den Westernblot mit Anti-G β common-, Anti-G γ - und Anti-HA-Antikörpern	42
3.6.8.	Lösungen für den Westernblot mit dem Tetra-His-Antikörper	43
3.7.	Zellkultur	43
3.7.1.	Kultur der HEK 293- und HEK-TSA-Zellen	43
3.7.2.	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin	44
3.8.	Bakterienkultur	44
3.8.1.	Zubereitung von LB-Medium für die Bakterienkultur	44
3.8.2.	Herstellung von Agarplatten	44
3.8.3.	Kultur von <i>E. coli</i>	44
3.9.	Molekularbiologische Methoden	45
3.9.1.	Allgemeine molekularbiologische Arbeitsmethoden	45
3.9.1.1.	Spektralphotometrische Messungen	45
3.9.1.2.	Herstellung eines 1,5-prozentigen Agarosegels für die Elektrophorese	45
3.9.1.3.	Transformation von <i>E. coli</i>	45
3.9.1.4.	Plasmidpräparation	46
3.9.2.	Polymerase-Kettenreaktion	47
3.9.2.1.	Allgemeines zur Polymerase-Kettenreaktion (=PCR)	47
3.9.2.2.	PCR mit der <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	47
3.9.2.3.	„Klon-PCR“ zum Nachweis rekombinanter Transformanten	48
3.9.3.	Klonierung von G γ_{13} und Herstellung von G γ_{13} in pcDNA31 ⁺	48
3.9.3.1.	RNA-Präparation	49
3.9.3.2.	cDNA-Synthese	49
3.9.3.3.	PCR des Produktes der Reverse Transkriptase-Reaktion	49
3.9.3.4.	Ligation und Klonierung von G γ_{13} in pGEM-T Easy	50
3.9.3.5.	Herstellung von G γ_{13} in pcDNA31 ⁺	50
3.9.4.	<i>Epitope Tagging</i> von G γ - und G β -Proteinen durch PCR-Mutagenese mit HA-tag- bzw. His-tag-Primern	51
3.9.4.1.	PCR-Mutagenese	52
3.9.4.2.	Restriktion von PCR-Produkt und pcDNA31 ⁺ -Vektor	53
3.9.4.3.	Ligation in pcDNA31 ⁺	54
3.9.5.	Expression der hergestellten Expressionsplasmide durch transiente Transfektion von HEK-TSAZellen	54
3.9.5.1.	Transiente Transfektion mit metabolischer Markierung	55
3.9.5.2.	Beurteilung der Transfektionseffizienz	56
3.9.6.	<i>In vitro</i> -Translation	57
3.10.	Westernblot-Untersuchungen	57
3.10.1.	Herstellung von Ganzzelllysaten für den Westernblot	57

3.10.2.	Proteinbestimmung	58
3.10.3.	Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE	58
3.10.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrottransfer	58
3.10.5.	Immunologischer Nachweis der durch HA-tag und His-tag markierten Proteine im Westernblot	60
3.10.5.1.	Immunologischer Nachweis von Hexahis-markierten Proteinen mit einem Tetra-His-Antikörper	60
3.10.5.2.	Immunologischer Nachweis HA-tag-markierter Proteine	60
3.10.5.3.	Immunologischer Nachweis von (HA-)G γ ₁ mit einem G γ ₁ -Antikörper	61
3.11.	Ko-Immunpräzipitation	61
3.11.1.	Prinzip der Immunpräzipitation	61
3.11.2.	Ko-Immunpräzipitation <i>in vitro</i> translaterter HA-G γ -G β -Dimere	63
3.11.2.1.	<i>In vitro</i> -Translation	63
3.11.2.2.	Dimerisierung	63
3.11.2.3.	Ko-Immunpräzipitation	64
3.11.2.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	65
3.11.2.5.	Autoradiographie und quantitative Auswertung durch Densitometrie	65
3.11.3.	Immunpräzipitation von HA-G γ -G β -Dimeren nach Transfektion von HEK-TSA und metabolischer Markierung	65
3.11.3.1.	Transfektion und metabolische Markierung	65
3.11.3.2.	Lyse der Zellen	66
3.11.3.3.	Ko-Präzipitation der synthetisierten HA-G γ -G β -Dimere	66
4.	Ergebnisse	68
4.1.	Herstellung und Mutagenese von Plasmiden für die Expression von G β - und G γ -Untereinheiten	68
4.1.1.	PCR-Mutagenese	68
4.1.2.	Expressionskontrolle der „ <i>epitope tag</i> -Konstrukte“ durch transiente Transfektion	68
4.1.2.1.	Immunologischer Nachweis der Expression der His-G β -Konstrukte	69
4.1.2.2.	Immunologischer Nachweis der Expression der HA-G γ -Konstrukte	69
4.2.	Klonierung von G γ ₁₃ und Epitopmarkierung	71
4.2.1.	Klonierung von G γ ₁₃	72
4.2.2.	<i>Epitope Tagging</i> und Umklonierung von G γ ₁₃	73
4.3.	Ko-Immunpräzipitation von HA-G β γ -Dimeren	73
4.3.1.	Immunpräzipitation von durch <i>in vitro</i> -Translation hergestellten HA-G β γ -Dimeren	74
4.3.1.1.	Spezifitätskontrolle der Immunpräzipitationsexperimente	76
4.3.1.2.	Ko-Immunpräzipitation <i>in vitro</i> translaterter G β - und G γ -Proteine	77
4.3.2.	Kinetik der Dimerisierung von G β - und G γ -Varianten	82
4.3.3.	Immunpräzipitation von <i>in vivo</i> generierten G β γ -Dimeren	84
5.	Diskussion	89
5.1.	Dimerisierung <i>in vitro</i> translaterter G β - und G γ -Proteine	90

5.2.	Interaktion von G β_3 -Varianten mit G γ -Proteinen <i>in vivo</i>	92
5.3.	G β -G γ -Spezifitäten – Was ist gesichert?	95
5.4.	G β_{3s} , G β_{3s2} und der Phänotyp einer gesteigerten Signaltransduktion	97
6.	Zusammenfassung	102
7.	Literaturverzeichnis	103
8.	Anhang	113
	Abkürzungsverzeichnis	113
	Danksagungen	115
	Lebenslauf	116

1. Kurzfassung

Ausgehend von Untersuchungen zu genetischen Ursachen der essentiellen Hypertonie, war von der Arbeitsgruppe Siffert bei einer Gruppe von Hypertonikern ein Phänotyp beschrieben worden, der sich durch eine gesteigerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine auszeichnete. Bei der systematischen Sequenzierung vieler G-Protein-Untereinheiten wurde ein Polymorphismus (C825T) im Gen der G-Proteinuntereinheit $G\beta_3$ (*GNB3*) gefunden, dessen T-Allel mit dem Phänotyp der gesteigerten Signaltransduktion in enger Assoziation stand (Siffert et al., 1998). In größeren epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass das *GNB3* 825T-Allel mit verschiedenen Krankheiten (z.B. arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus) sowie mit der Schwere ihrer Ausprägung und mit ihren Folgen assoziiert ist (Siffert et al., 1998; Benjafield et al., 1998; Dong et al., 1999; Morrison et al., 2001; Siffert et al., 1999a, 1999b; Blüthner et al., 1999). Darüber hinaus wurde gefunden, dass das 825T-Allel geeignet ist, Medikamentennebenwirkungen vorherzusagen (Turner et al., 2000; Zill et al., 2000). Einige dieser Ergebnisse sind nicht unwidersprochen geblieben (Brand et al., 1999; Snapir et al., 2001; Schunkert et al., 1998).

Gegenstand vielfältiger Bemühungen ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen, durch die ein – in diesem Fall primär „stummer“ – Polymorphismus solch komplexe Phänotypen entstehen lassen kann. Man entdeckte dabei frühzeitig, dass das 825T-Allel mit dem Auftreten einer Spleißvariante assoziiert ist, die mit $G\beta_{3s}$ bezeichnet wurde. In weiteren Analysen wurde eine weitere Spleißvariante, $G\beta_{3s2}$, entdeckt, die ebenfalls mit dem 825T-Allel in Assoziation steht (Roskopf et al., 2003).

$G\beta$ -Proteine gehören zur Superfamilie der Propellerproteine und sind aus sieben sogenannten WD-Domänen zusammengesetzt. Funktionell bilden solche $G\beta$ -Untereinheiten mit G-Protein- γ -Untereinheiten stabile Dimere. Man kennt derzeit fünf verschiedene $G\beta$ -Gene und zwölf unterschiedliche $G\gamma$ -Gene. Daraus resultieren theoretisch 60 verschiedene $G\beta\gamma$ -Dimere (Spleißvarianten ausgenommen), die ihrerseits mit der Entstehung einer Rezeptor-Effektor-Spezifität in Verbindung gebracht werden. Es ist allerdings umstritten, ob alle diese $G\beta\gamma$ -Dimere existieren.

Im Falle von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ fehlt jeweils das Äquivalent einer WD-Domäne, so dass man theoretisch von Propellerproteinen mit sechs Propellern ausgehen müsste. Tatsächlich existieren auch Nicht- $G\beta$ -Proteine mit nur 4, 5 oder 6 WD-Domänen (Neer et al., 1994).

Aufgabe dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ mit $G\gamma$ -Untereinheiten stabile Dimere bilden können und welche Spezifitäten bei der Ausbildung solcher Dimere bestehen. Zu diesem Zweck wurden die $G\gamma$ -Untereinheiten $G\gamma_1$, $G\gamma_2$, $G\gamma_3$, $G\gamma_4$, $G\gamma_5$, $G\gamma_7$, $G\gamma_{8cone}$, $G\gamma_{10}$, $G\gamma_{11}$, $G\gamma_{12}$ und $G\gamma_{13}$ durch PCR-Mutagenese mit einem N-terminalen HA-Epitop versehen. Es ist von anderen Arbeitsgruppen bekannt, dass diese Modifikation grundlegende Eigenschaften von $G\gamma$ -Proteinen nicht stört. Mit einem Anti-HA-Antikörper können solche modifizierten $G\gamma$ -Proteine präzipitiert werden. Liegen sie in einem Dimer mit einer $G\beta$ -Untereinheit vor, wird diese „ko-präzipitiert“ und lässt sich z.B. im Westernblot oder nach radioaktiver Markierung nachweisen.

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen wurden die $G\beta$ -Proteine $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$, $G\beta_{3s}$, $G\beta_{3s2}$ und $G\beta_4$ mit einbezogen. Solche Experimente wurden in diesem Umfang erstmalig in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. In einer ersten Versuchsserie wurden $G\beta$ - und HA- $G\gamma$ -Untereinheiten in getrennten Ansätzen durch *in vitro*-Translation generiert und durch Zusatz von [35 S] Methionin markiert. Einzelne $G\beta$ - und HA- $G\gamma$ -Untereinheiten wurden dann gemischt und in Anwesenheit von *in vitro*-Translationsmischung inkubiert. Es ist bekannt, dass für die ordnungsgemäße Prozessierung von $G\beta\gamma$ -Dimeren Chaperonine – wie sie hier in der Translationsmischung vorhanden sind – notwendig sind. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation.

In einer zweiten Versuchsserie wurde eine Auswahl möglicher $G\beta\gamma$ -Dimere unter dem Gesichtspunkt einer besseren Prozessierung unter *in vivo*-Bedingungen untersucht. Hierzu wurden die modifizierten HA- $G\gamma$ -Proteine und $G\beta$ -Proteine, die eine Hexa-His-Modifikation trugen, durch Transfektion in HEK-Zellen überexprimiert und anschließend metabolisch markiert. Nach Lyse dieser Zellen erfolgte die Präzipitation unter Verwendung des Anti-HA-Antikörpers.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wildtypproteine $G\beta_1$ - $G\beta_4$ in der Lage sind, mit allen untersuchten $G\gamma$ -Untereinheiten zu dimerisieren. In den meisten Fällen wurden die $G\beta$ -Isoformen $G\beta_1$, $G\beta_2$ und $G\beta_4$ am stärksten präzipitiert, gefolgt von $G\beta_3$. Des Weiteren konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die neu entdeckten $G\beta_3$ -Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ ebenfalls in der Lage sind, mit allen $G\gamma$ -Isoformen – außer mit $G\gamma_2$ – präzipitierbare Dimere zu bilden. Allerdings war ihre Interaktion meist deutlich schwächer ausgeprägt als die des Wildtypproteins. Es fiel ins Auge, dass die kurzen $G\beta_3$ -Isoformen mit den $G\gamma$ -Untereinheiten $G\gamma_1$, $G\gamma_{8cone}$ und $G\gamma_{11}$, die sich von den anderen $G\gamma$ -Proteinen durch ihre Lipidmodifikation (Farnesylierung vs. Geranylgeranylierung) unterscheiden, besonders gut

dimerisieren. Aber auch die Interaktion mit der erst kürzlich entdeckten $G\gamma_{13}$, die eine Geranylgeranyl-Modifikation aufweist, war bemerkenswert stark ausgeprägt.

Unter *in vivo*-Bedingungen war die Dimerisierung von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ mit den untersuchten $G\gamma$ -Isoformen $G\gamma_5$, $G\gamma_{8cone}$ und $G\gamma_{12}$ begünstigt. Bemerkenswert war vor allem, dass hierbei die Interaktion der kurzen $G\beta_3$ -Isoformen mit $G\gamma_{8cone}$ genauso effektiv war wie die von $G\beta_1$ und Wildtyp- $G\beta_3$.

Zusammengefasst zeigen die Experimente der vorliegenden Arbeit, dass die neu entdeckten $G\beta_3$ -Isoformen trotz ihrer bemerkenswerten Deletion in der Lage sind, mit den verschiedenen $G\gamma$ -Untereinheiten stabile Dimere zu bilden. Sie besitzen somit ein wichtiges Charakteristikum von $G\beta$ -Proteinen. Weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe belegten, dass $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ mit Effektoren und Rezeptoren reagieren können. Sowohl die hier gezeigten biochemisch-strukturellen Daten als auch die funktionellen Ergebnisse belegen, dass $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ wichtige Eigenschaften von $G\beta$ -Proteinen besitzen.

Basierend auf diesen Ergebnissen muss in weiteren Untersuchungen der molekulare Nachweis geführt werden, wie im Einzelnen die beiden $G\beta_3$ -Varianten Signaltransduktionsprozesse beeinflussen können und damit den Phänotyp einer gesteigerten Signaltransduktion entstehen lassen.

2. Einleitung

Heterotrimere G-Proteine sind an der Signalübertragung der meisten Rezeptoren im menschlichen Körper beteiligt. Sie bestehen aus einer $G\alpha$ -Untereinheit und einem $G\beta\gamma$ -Dimer, das sich aus den Untereinheiten $G\beta$ und $G\gamma$ zusammensetzt. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Analyse, inwieweit neu entdeckte Spleißvarianten der G-Proteinuntereinheit $G\beta_3$ in der Lage sind, mit den verschiedenen $G\gamma$ -Untereinheiten stabile Dimere zu bilden. In der folgenden Einleitung wird daher zuerst eine kurze Einführung in das System der G-Protein-gekoppelten Signalübertragung gegeben. Die Struktur der drei Untereinheiten und ihre Isoformen sollen im Anschluss daran behandelt werden. Im darauf folgenden Abschnitt werden dann zwei neue Spleißvarianten der G-Proteinuntereinheit $G\beta_3$ vorgestellt, die mit dem T-Allel des C825T-Polymorphismus im Gen *GNB3* assoziiert sind, welcher 1998 von Siffert et al. entdeckt wurde. Am Ende dieses Kapitels werden schließlich einige etablierte Methoden zur Untersuchung der Dimerisierung von $G\beta\gamma$ -Einheiten umrissen und die in dieser Arbeit angewandte Methode der Immunpräzipitation kurz vorgestellt.

2.1. Heterotrimere G-Proteine

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind in der Zellmembran aller Zellen des Organismus vorhanden. Mehr als tausend derartiger Rezeptoren, die typischerweise die Zellmembran mit sieben Transmembranhelices durchspannen, sind bisher bekannt, und jeder ist spezifisch für ein bestimmtes Signal, das aus dem extrazellulären Raum auf die Zelle trifft. Dieses Signal kann chemischer (z.B. Hormone, Neurotransmitter, Geruchsstoffe) oder physikalischer (Licht) Natur sein. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die sich auf ein nachgeschaltetes G-Protein überträgt und dieses aktiviert (Neer, 1995).

G-Proteine besitzen eine heterotrimere Struktur, d.h. sie bestehen aus drei Untereinheiten: der $G\alpha$ -, der $G\beta$ - und der $G\gamma$ -Untereinheit. Die Molekulargewichte der Untereinheiten betragen im Falle der $G\alpha$ -Proteine (von wenigen Ausnahmen abgesehen) 39 – 43 kDa, ca. 35 – 44 kDa im Falle der $G\beta$ -Proteine und im Falle der $G\gamma$ -Proteine 6 – 8 kDa. Die $G\alpha$ -Untereinheit hat die Fähigkeit, Guaninnukleotide zu binden (daher der Name „G-Proteine“) und besitzt eine enzymatische GTPase-Aktivität. $G\beta$ und $G\gamma$ bilden zusammen die $G\beta\gamma$ -Untereinheit, welche sich wie ein funktionelles Monomer verhält und nur durch Denaturierung in $G\beta$ und $G\gamma$

getrennt werden kann (Übersichtsartikel bei Clapham und Neer, 1997; Gautam et al., 1998; Downes und Gautam, 1999; Neves et al., 2002).

2.1.1. Rezeptoraktivierung und GTPase-Zyklus

Das G-Protein stellt im inaktiven Zustand ein Heterotrimer dar und die $G\alpha$ -Untereinheit hat ein Molekül GDP gebunden. Wird nun ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor durch die Bindung eines geeigneten Liganden aktiviert (Schritt (1) in Abbildung 2.1), so verändert sich die Konformation seiner intrazellulären Domänen. Diese Konformationsänderung überträgt sich wiederum auf das an ihn gebundene G-Protein ($G\alpha^*GDP\ G\beta\gamma$) und versetzt es in einen aktivierten Zustand, welcher an der $G\alpha$ -Untereinheit die Öffnung der Bindungstasche für Guaninnukleotide und damit die Dissoziation des GDP bewirkt. Der Komplex aus G-Protein und Rezeptor bleibt dann noch so lang bestehen, bis ein GTP-Molekül, das in der Zelle im Vergleich zu GDP im Überschuss vorkommt, an die frei gewordene Guaninnukleotid-Bindungsstelle der $G\alpha$ -Untereinheit bindet (2).

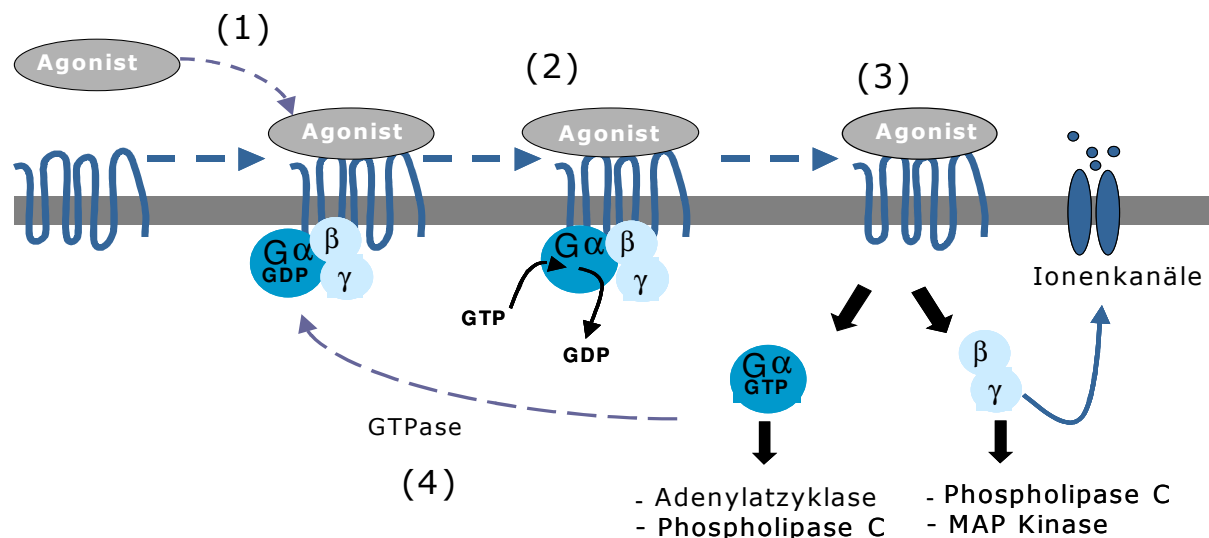


Abb. 2.1: Schemazeichnung des GTPase-Zyklus. Erläuterung im Text.

Dadurch kommt es zur Dissoziation des Heterotrimers in $G\alpha^{*}GTP$ und $G\beta\gamma$. Beide lösen sich vom Rezeptor, um unabhängig voneinander ihre Effektoren zu aktivieren (3). Dieser aktive Zustand des $G\alpha$ -Proteins hält so lange an, bis das GTP, welches an die $G\alpha$ -Untereinheit gebunden ist, durch deren intrinsische GTPase-Aktivität zu GDP hydrolysiert worden ist (4). $G\alpha^{*}GDP$ und ein freies $G\beta\gamma$ finden sich dann wieder zum Heterotrimer ($G\alpha^{*}GDP\ G\beta\gamma$)

zusammen, welches erneut von einem stimulierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert werden kann (Übersichtsartikel bei Hamm, 1998).

2.1.2. Familien der G-Proteine und ihre Effektoren

Es sind bisher 16 Gene für $G\alpha$ -Untereinheiten, 5 Gene für $G\beta$ -Untereinheiten und 12 für $G\gamma$ -Proteine kodierende Gene bekannt (Downes und Gautam, 1999). G-Proteine lassen sich anhand der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen ihrer $G\alpha$ -Untereinheiten in vier Familien einteilen (Neer, 1995):

- a) $G\alpha_s$ ($G\alpha_s$, $G\alpha_{olf}$)
- b) $G\alpha_i$ ($G\alpha_{i-1}$, $G\alpha_{i-2}$, $G\alpha_{i-3}$, $G\alpha_0$, $G\alpha_t$, $G\alpha_{gust}$, $G\alpha_z$)
- c) $G\alpha_q$ ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{16}$)
- d) $G\alpha_{12}$ ($G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$)

$G\alpha$ -Untereinheiten der ersten beiden Klassen besitzen die Eigenschaft von bestimmten bakteriellen Toxinen modifiziert werden zu können: Durch die Übertragung eines ADP-Ribose-Restes auf eine $G\alpha_s$ -Untereinheit durch Cholera toxin, das Enterotoxin des Bakteriums *Vibrio cholerae*, wird dessen GTPase-Aktivität inaktiviert und es resultiert eine Daueraktivierung des Proteins. Zur G_i -Familie gehörige $G\alpha$ -Untereinheiten dagegen können – mit Ausnahme von $G\alpha_z$ – durch Pertussis toxin, das Toxin des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis*, ADP-ribosyliert werden, wodurch das G-Protein vom Rezeptor entkoppelt und somit inaktiviert wird. Sie werden aus diesem Grunde „Pertussis toxin- (PTX-) sensitive $G\alpha$ -Untereinheiten“ genannt.

Die Adenylatzyklase, welche ATP in den sekundären Botenstoff cAMP umwandelt, ist sozusagen der „klassische Effektor“ von $G\alpha$ -Untereinheiten. Sie wird von $G\alpha_s$ stimuliert und von $G\alpha_i$ inhibiert. Mittlerweile kennt man aber eine Vielzahl weiterer Effektoren von G-Proteinen:

So sind G-Proteine der G_i -Klasse an der Regulation von Ca^{2+} - und K^{+} -Kanälen beteiligt – allerdings wird diese Wirkung wahrscheinlich nicht direkt durch die $G\alpha_i$ -Untereinheit, sondern durch die von ihr freigesetzte $G\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelt (s.u.). $G\alpha_q$ -Untereinheiten stimulieren die Phospholipase C β . Eine regulierende Funktion beim Na^{+}/H^{+} -Austausch wird den $G\alpha$ -Untereinheiten der G_{12} -Klasse zugeschrieben. Die $G\alpha_t$ -Untereinheiten, welche ausschließlich in den Photorezeptoren der Retina vorkommen, aktivieren die cGMP-Phosphodiesterase, was ein essentieller Schritt des Sehvorgangs ist (Übersicht bei Neer, 1995).

In den Anfängen der G-Protein-Forschung bestand lange Zeit die Vorstellung, dass freie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten, welche selber keine enzymatische Aktivität besitzen, im Gegensatz zu den aktiven $G\alpha$ -Untereinheiten nur als negative Regulatoren fungierten. Heute weiß man jedoch, dass die Effektorwirkungen der $G\beta\gamma$ -Untereinheiten ebenso vielfältig sind wie die der $G\alpha$ -Proteine: So aktivieren $G\beta\gamma$ -Dimere u.a. einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle, die Phospholipase $C\beta$ und Isoformen der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Weiterhin können sie einige Adenylatzyklase-Isoformen aktivieren und andere inhibieren, die MAP-Kinase-Kaskade aktivieren und durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK), wie z.B. der β -Adrenozeptorkinase, die Desensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bewirken (Clapham und Neer, 1997). Darüber hinaus kommt der $G\beta\gamma$ -Untereinheit eine entscheidende Rolle bei der Auslösung einer chemotaktischen Antwort zu (Arai et al., 1997).

2.2. Das $G\beta\gamma$ -Dimer

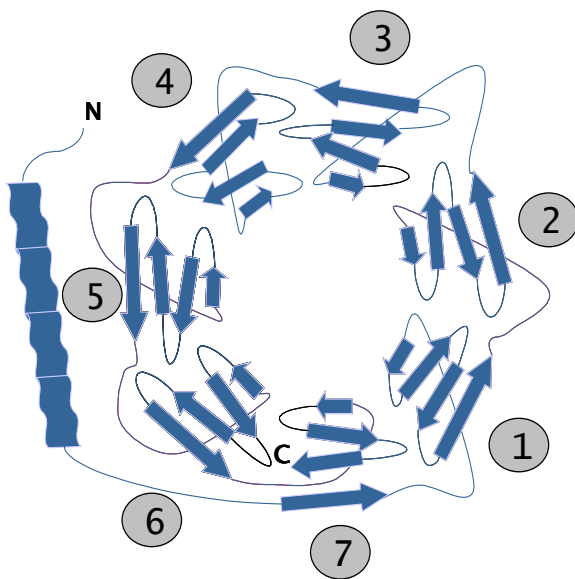
Eine wichtige und charakteristische Eigenschaft von $G\beta$ -Untereinheiten, welche in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht werden soll, ist ihre Fähigkeit Dimere mit $G\gamma$ -Untereinheiten zu bilden. Im Folgenden werden daher zunächst die beiden Untereinheiten getrennt besprochen um schließlich die Struktur des $G\beta\gamma$ -Dimers zu erläutern.

2.2.1. Die G-Protein β -Untereinheit

Die $G\beta$ -Untereinheit besteht aus zwei strukturell unterschiedlichen Regionen: Das N-terminale Segment wird von einer α -Helix von ungefähr 20 Aminosäuren Länge gebildet. Ihm schließen sich sieben sogenannte „WD-Repeats“ an. Eine WD-Domäne besteht aus einem Kernbereich von ca. 40 Aminosäuren Länge, der in seiner Struktur recht konserviert ist. Diese 40 Aminosäuren werden typischerweise begrenzt von den Dipeptiden Glyzin-Histidin (GH) und Tryptophan-Aspartat (WD, daher „WD-Repeats“) und von einer Region variabler Länge, welche das vorausgehende WD mit dem nächsten GH verbindet.

Die β -Untereinheit der G-Proteine gehört somit zur Superfamilie der „WD-Repeat“-Proteine, welche ca. 140 verschiedene Proteine umfasst. Dabei gibt es Proteine mit vier, fünf, sechs, sieben und acht WD-Domänen. Die Mitglieder der Familie haben in eukaryotischen Zellen verschiedene regulatorische Funktionen: So sind einige „WD-Repeat“-Proteine an der

Die Gβ₁-Untereinheit ist das erste Mitglied der WD-Repeat-Protein-Familie, dessen Kristallstruktur bestimmt wurde: 1996 wurde von Sondek et al. die Struktur des Gβγ-Dimers von Transduzin beschrieben. Das Protein besitzt eine N-terminale α-Helix, auf die eine propellerartige Struktur folgt, welche von den sieben ringförmig angeordneten WD-Domänen gebildet wird (Schemazeichnung in Abb. 2.2). Jedes der sieben Propellerblätter besteht aus vier antiparallelen β-Strängen. Die inneren β-Stränge verlaufen parallel zur zentralen Achse und bilden so die Wände eines wassergefüllten Tunnels. Die äußeren Stränge, die vom Zentrum ausstrahlen, kippen dann aber um, so dass eine „Torus“-artige Struktur entsteht, dessen „Boden“ von den sieben äußersten Strängen und dessen „Spitze“ von den inneren Strängen gebildet wird („Torus“ heißt der sich nach oben hin verjüngende Teil einer attischen Säulenbasis).



Die Definition der WD-Domäne als lineares Proteinmotiv erfolgte vor der Kristallisierung von G β ₁. Daraus erwächst jetzt die Besonderheit, dass eine WD-Domäne jeweils in der Biegung zwischen dem dritten und vierten Strang eines β -Faltblattes beginnt und an der

entsprechenden Stelle des folgenden Blattes endet. Die Propellerstruktur erhält einen starken Halt dadurch, dass der äußere Strang des siebten Blattes durch den N-terminalen Strang der ersten WD-Domäne gebildet wird, wodurch Anfang und Ende des Propellers miteinander verbunden werden.

Da die G β -Isoformen G β_1 bis G β_4 eine Homologie ihrer Aminosäuresequenzen von 78 - 88% aufweisen und die für die Ausbildung der Propellerstruktur wichtigen Regionen bei allen G β -Proteinen in hohem Maße konserviert sind (Clapham und Neer, 1997), können die aus den Kristallisationsdaten gewonnenen Informationen über die Struktur von G β_1 in der Hauptsache auf G β_2 , G β_3 und G β_4 übertragen werden.

2.2.2. Die G γ -Untereinheit

2.2.2.1. Struktur und Funktion von G γ -Proteinen

G γ -Untereinheiten sind erheblich kleiner als G β -Untereinheiten (6 – 8 kDa vs. 35 – 44 kDa) und haben eine im Wesentlichen α -helikale Struktur. Während die G β -Isoformen G β_1 , G β_2 , G β_3 und G β_4 , wie bereits oben erwähnt, mit einer Identität ihrer Aminosäuresequenzen von 78 - 88% äußerst homolog sind (Watson et al., 1994) – allein G β_5 und seine Spleißvariante G β_{5L} unterscheiden sich stärker von ihnen (Watson et al., 1996) –, sind die zwölf bekannten G γ -Isoformen nur zu 27 - 76% identisch (Huang et al., 1999).

Wie die Rezeptor- und Effektorspezifität bei der Signaltransduktion über heptahelikale Rezeptoren zustande kommt, ist bislang noch nicht gut verstanden. Die heterotrimeren G-Proteine scheinen daran in entscheidender Weise beteiligt zu sein. Wie eingangs berichtet, gibt es fünf verschiedene G β -Gene und mindestens drei verschiedene Spleißvarianten (G β_{3s} , G β_{3s2} und G β_{5L}). Des Weiteren sind bisher zwölf verschiedene G γ -Gene identifiziert worden. Rein rechnerisch sind also 60 bzw. 84 verschiedene G $\beta\gamma$ -Dimerkombinationen möglich. Diese theoretische Vielfalt, die durch die verschiedenen G α -Untereinheiten zusätzlich erweitert wird, könnte einen entscheidenden Faktor bei der Ausbildung der Rezeptor-Effektorspezifität darstellen. Möglicherweise spielen hierbei die G γ -Untereinheiten aufgrund ihrer Heterogenität eine besondere Rolle. Im Einzelnen sollen 15 Aminosäuren am N-Terminus von G γ die Spezifität der α - γ -Interaktion vermitteln (Rahmatullah et al., 1995). Einer Aminosäuresequenz in der Mitte des G γ -Moleküls wird eine wichtige Rolle bei der Spezifität der G $\beta\gamma$ -Interaktion zugeschrieben (Spring und Neer, 1994) und die C-terminale G γ -Region ist beteiligt an der Kopplung an Rezeptoren (Kisselev et al., 1995; Yasuda et al., 1996). Im Rahmen der

posttranslationalen Modifikation werden die $G\gamma$ -Untereinheiten außerdem am C-Terminus prenyliert. Hierbei wird allen $G\gamma$ -Isoformen mit Ausnahme von $G\gamma_1$, $G\gamma_{8c}$ und $G\gamma_{11}$ jeweils eine C_{20} -Geranylgeranylgruppe angefügt; letztere Isoformen erhalten eine weniger lipophile C_{15} -Farnesylgruppe (Ray et al., 1995; Ong et al., 1995; Balcueva et al., 2000). Diese Modifikation verleiht den $G\gamma$ -Proteinen zum einen die Fähigkeit zur Verankerung in der Zellmembran und ist zum anderen notwendig für die Interaktion mit einigen Effektoren und einigen $G\alpha$ -Untereinheiten (Clapham und Neer, 1997).

2.2.2.2. Expression der verschiedenen $G\gamma$ -Isoformen

Während die $G\beta$ -Isoformen $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$ und $G\beta_4$ vermutlich ubiquitär exprimiert werden und nur die Expression von $G\beta_5$ und $G\beta_{5L}$ auf bestimmte Gewebe beschränkt ist – $G\beta_5$ findet man nur im zentralen Nervensystem (Watson et al., 1994) und $G\beta_{5L}$ ausschließlich in der Retina (Watson et al., 1996) –, weisen die einzelnen $G\gamma$ -Isoformen unterschiedliche Verteilungsmuster in den Organen und Geweben des Körpers auf.

Die als erste identifizierte Isoform $G\gamma_1$ wird ausschließlich in der Retina exprimiert, um es noch genauer zu sagen: in den äußeren Segmenten der Stäbchen (Gautam et al., 1990). $G\gamma_2$ und $G\gamma_7$ werden schwerpunktmäßig im Hirn exprimiert, man findet sie aber darüber hinaus in einer Vielzahl weiterer Gewebe. $G\gamma_3$ dagegen ist nur im Hirn nachweisbar (Gautam et al., 1990; Cali et al., 1992). Die Expression von $G\gamma_4$ ist auf wenige Gewebe (u.a. Skelettmuskel, Hirn, Niere, Pankreas) beschränkt (Ray et al., 1995). $G\gamma_5$, $G\gamma_{10}$ und $G\gamma_{12}$ werden ubiquitär exprimiert (Downes und Gautam, 1999). $G\gamma_{8olf}$ wiederum ist spezifisch für das Riechepithel und das vomeronasale Neuroepithel (Ryba et al., 1995). Was die Isoform $G\gamma_{8cone}$ betrifft, so hatte man zunächst angenommen, sie sei ausschließlich in den Zapfen der Netzhaut zu finden (Ong et al., 1995). Inzwischen geht man aber davon aus, dass sie in einer Reihe weiterer Gewebe exprimiert wird, vor allem auch im Herzen (Balcueva et al., 2000). $G\gamma_{11}$ ist weit verbreitet. Es wird ebenso wie $G\gamma_{8cone}$ in bemerkenswert hohem Maße im Herzen und darüber hinaus in Thrombozyten gefunden, zeigt jedoch nur eine schwache Expression im Hirn (Ray et al., 1995; Morishita et al., 1998; Balcueva et al., 2000).

Als bisher letzte $G\gamma$ -Isoform wurde im Jahre 1999 $G\gamma_{13}$ entdeckt, welches in Geschmackssinneszellen zusammen mit $G\alpha_{\text{gustduzin}}$ und $G\beta_3$ bzw. $G\beta_1$ exprimiert wird und einen Anstieg des Inositoltriphosphates (IP_3) als Reaktion auf die Stimulation durch bittere Geschmacksstoffe vermittelt (Huang et al., 1999). $G\gamma_{13}$ weist die geringste Ähnlichkeit mit

anderen $G\gamma$ -Isoformen auf und ist gleichzeitig die kleinste $G\gamma$ -Untereinheit. Weitere Gewebe, in denen $G\gamma_{13}$ exprimiert wird, sind die Retina, das Riechepithel und verschiedene Hirnregionen, besonders der Thalamus und das Kleinhirn (Blake et al., 2001).

2.2.3. Struktur der $G\beta\gamma$ -Untereinheit

Nachdem im Vorangegangenen zunächst $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit getrennt behandelt worden sind, soll nun das von ihnen gebildete $G\beta\gamma$ -Dimer vorgestellt werden, welches wichtige Funktionen bei der intrazellulären Signaltransduktion wahrnimmt (s. 2.1.2.).

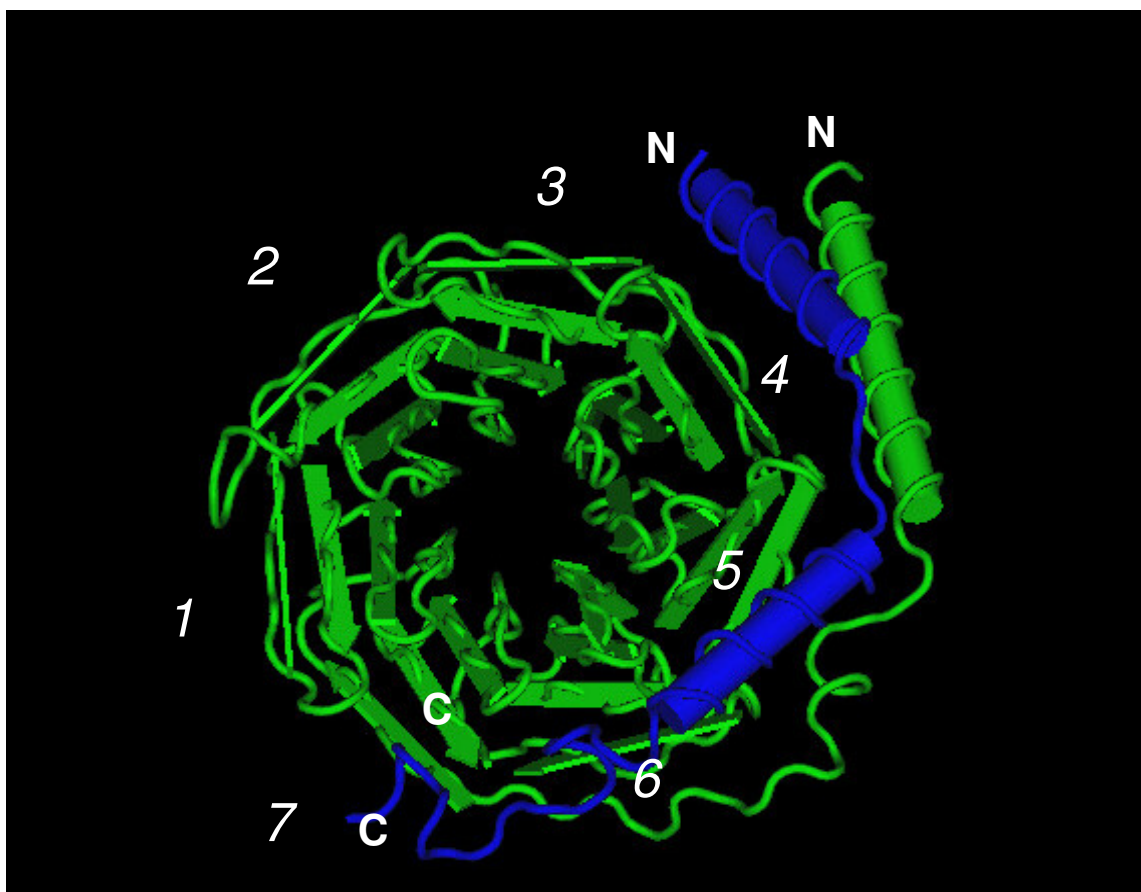


Abb. 2.3: Struktur eines $G\beta\gamma$ -Dimers

Die Abbildung wurde generiert aus den Kristallisationsdaten von Sondek et al., 1996. Sie zeigt die Ansicht eines $G\beta\gamma$ -Dimers von der Seite, die der $G\alpha$ -Untereinheit abgewandt ist. Die $G\beta$ -Untereinheit ist in grün, die $G\gamma$ -Untereinheit in blau dargestellt. α -helikale Strukturen werden durch Zylinder und β -Faltblätter durch flache Pfeile symbolisiert. Die sieben Blätter des $G\beta$ -Propellers sind nach der von Clapham und Neer (1997) benutzten Konvention nummeriert. N- und C-Terminus der beiden Untereinheiten werden durch „N“ bzw. „C“ angezeigt.

Man blickt auf den Boden des $G\beta$ -Propellers. Die $G\gamma$ -Untereinheit bildet Kontakte zur α -Helix des $G\beta$ -Proteins und zu den Blättern 5, 6 und 7 aus. Des weiteren ist erkennbar, dass der äußere Strang

des siebten Blattes durch den N-terminalen Strang der ersten WD-Domäne gebildet wird – der sogenannte „*velcro snap*–“ (d.h. Klettverschluss-) Mechanismus –, wodurch die Propellerstruktur gefestigt wird. Die Abbildung wurde erstellt mit dem *public domain* Programm Cn3D Version 4.0 des *National Institute for Bioinformation*.

Wie bereits oben erwähnt, haben Sondek et al. 1996 die Struktur des $G\beta_1\gamma_1$ -Dimers beschrieben, von der man annimmt, dass sie in ihren Grundzügen auf die meisten anderen $G\beta\gamma$ -Dimere übertragen werden kann. Wie in Abb. 2.3 zu sehen, bildet die erste α -Helix der $G\gamma$ -Untereinheit mit der N-terminalen α -Helix der $G\beta$ -Untereinheit eine *coiled coil*-Struktur aus, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird (Gautam et al., 1998). Der verbleibende Teil des $G\gamma$ -Moleküls spannt sich über den Boden des WD-Propellers und besitzt dort Kontakte zu den Blättern 5, 6 und 7 (Nummerierung der Propellerblätter nach der Konvention von Clapham und Neer, 1997).

2.3. Der C825T-Polymorphismus in *GNB3* und die $G\beta_3$ -Spleißvarianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$

Die Struktur von $G\beta$ -Proteinen ist im Vorangegangenen erläutert worden. Gegenstand der Arbeit ist die funktionelle Analyse von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$, zweier Spleißvarianten des für die $G\beta_3$ -Untereinheit kodierenden Gens *GNB3*. Bevor auf die Besonderheiten des Spleißvorgangs und die pathophysiologische Bedeutung dieser Varianten eingegangen wird, soll in diesem Zusammenhang zunächst ihre Struktur beschrieben werden. Anschließend werden unter 2.3.2. die Mechanismen des alternativen Spleißens erläutert. Unter 2.4. soll dann auf die klinische Bedeutung des C825T-Polymorphismus in *GNB3* eingegangen werden.

2.3.1. $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$, zwei neue Isoformen der $G\beta_3$ -Untereinheit

Im Jahr 1998 entdeckte die Arbeitsgruppe Siffert bei Untersuchungen an Zellen von Hypertonikern einen Polymorphismus im Gen *GNB3*, welches für die $G\beta_3$ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine kodiert, den C825T-Polymorphismus. Man fand außerdem eine in Assoziation mit dem T-Allel dieses Polymorphismus auftretende, kürzere mRNA-Variante, welche für eine neue $G\beta_3$ -Isoform, $G\beta_{3s}$ („s“ für „short“) genannt, kodiert (Siffert et al., 1998). $G\beta_{3s}$ unterscheidet sich vom Wildtyp- $G\beta_3$ -Protein dadurch, dass ihm das Äquivalent genau einer WD-Domäne fehlt, nämlich die letzten vier Aminosäuren der dritten und der Großteil der vierten WD-Domäne mit Ausnahme ihrer letzten fünf Aminosäuren. Das bedeutet, dass

die Deletion den äußeren Teil des dritten und den inneren Teil des vierten Propellerblattes betrifft (s. Abb. 2.3a). Da die sieben Propellerblätter des Wildtyp- $G\beta_3$ aus seinen sieben WD-Domänen gebildet werden (s. 2.2.1. und Abb. 2.2), nimmt man an, dass $G\beta_{3s}$ als Protein mit sechs WD-Domänen eine sechsblättrige Propellerstruktur ausbildet (s. Abb. 2.3c). Diese Vorstellung wird dadurch unterstützt, dass es in der WD-Repeat-Familie eine Reihe von Proteinen mit sechs WD-Domänen gibt (Neer et al., 1994). Einige Zeit später wurde eine zweite mit dem 825T-Allel assoziierte $G\beta_3$ -Isoform, $G\beta_{3s2}$, entdeckt, welche ebenfalls sechs anstelle von sieben WD-Domänen besitzt und daher vermutlich, ähnlich wie $G\beta_{3s}$, auch einen sechsblättrigen Propeller ausbildet (Rosskopf et al., 2002b). Im Falle von $G\beta_{3s2}$ ist allerdings ein anderer Teil der Propellerstruktur betroffen: Hier fehlen die drei äußeren Stränge des fünften und der innere Strang des sechsten Propellerblattes (s. Abb. 2.3b).

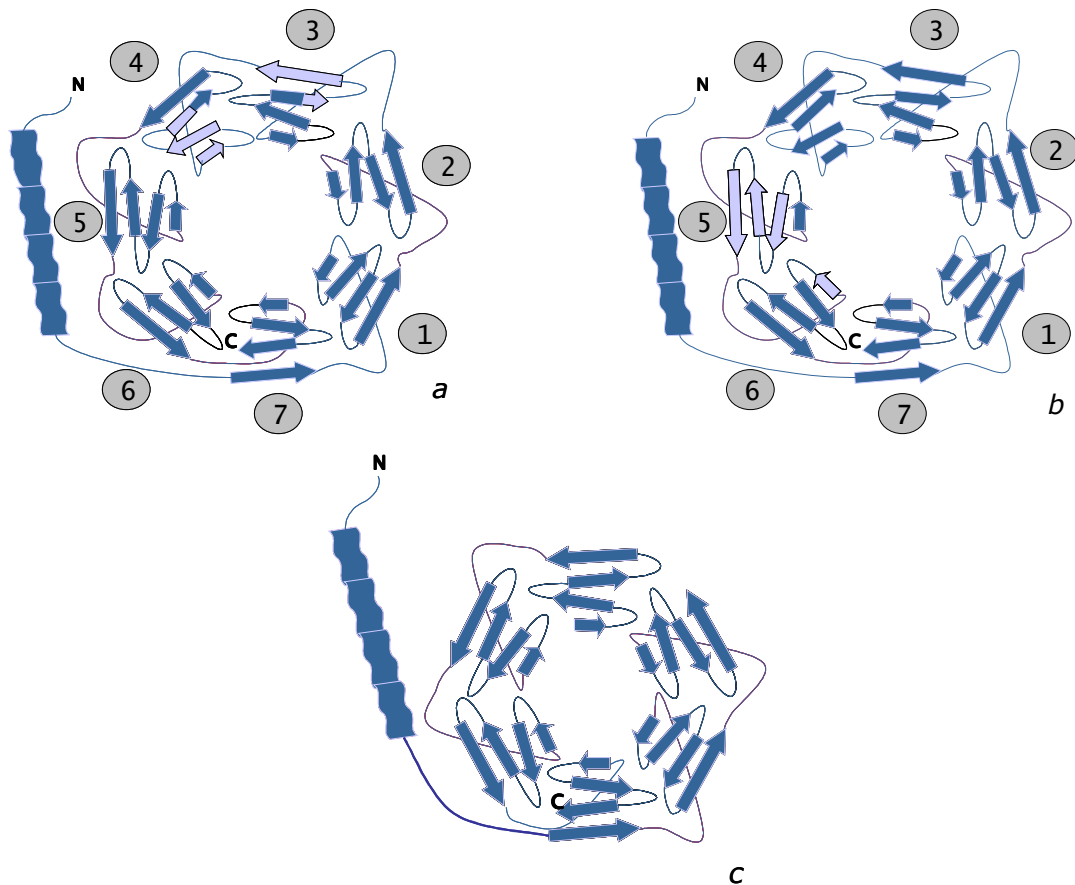


Abb. 2.4: Die neu entdeckten $G\beta_3$ -Isoformen $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$

In *a* und *b* werden die Deletionen der $G\beta_3$ -Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ gegenüber dem Wildtyp- $G\beta_3$ durch helle Pfeile symbolisiert: Bei $G\beta_{3s}$ fehlen die äußere Region des dritten und der Großteil des vierten Propellerblattes (*a*); die Deletion von $G\beta_{3s2}$ betrifft den Großteil des fünften und den inneren

Strang des sechsten Propellerblattes (*b*). In *c* ist die vermutete Struktur der beiden kurzen $G\beta_3$ -Isoformen dargestellt: Wahrscheinlich handelt es sich um $G\beta_3$ -Proteine mit sechsblättrigem Propeller.

2.3.2. Alternatives Spleißen von *GNB3* in Assoziation mit dem C825T-Polymorphismus

Das für die G-Protein-Untereinheit $G\beta_3$ kodierende Gen *GNB3* ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert und erstreckt sich über eine Länge von 7,5 kb. Es ist aus 10 Introns und 11 Exons aufgebaut (Rosskopf et al., 2000; s. Abb. 2.5). Siffert et al. entdeckten 1998 einen Einzelbasen-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) in Exon 10, den erwähnten C825T-Polymorphismus. Der Austausch des Cytosin durch ein Thymidin verändert dabei die Aminosäuresequenz des Proteins zwar nicht direkt, d.h. die vom entsprechenden Triplet kodierte Aminosäure bleibt gleich. Das 825T-Allel ist jedoch mit dem Auftreten zweier $G\beta_3$ -Spleißvarianten, genannt $G\beta_{3s}$ bzw. $G\beta_{3s2}$, assoziiert. Die als Erste entdeckte Spleißvariante $G\beta_{3s}$ weist eine Deletion von 123 Nukleotiden im Exon 9 (nt 498-620) auf (s. Abb. 2.5). Diese mRNA kodiert für das unter 2.3.1. vorgestellte Protein $G\beta_{3s}$. Interessanterweise ist nun die Deletion in $G\beta_{3s}$ mehr als 1700 bp von dem SNP C825T entfernt und es ist schwer zu erklären, wie ein SNP auf diese Entfernung das alternative Spleißen beeinflussen kann, obschon einige Präzedenzfälle aus der Literatur bekannt sind (z.B. Stallings-Mann et al., 1996). Weitere Untersuchungen ergaben dann aber, dass das 825T-Allel bzw. das 825C-Allel bei Kaukasiern jeweils mit sieben weiteren Polymorphismen in engem Kopplungsungleichgewicht stehen. Es wurden daher zwei prädominante Haplotypen – der C-Haplotyp und der T-Haplotyp – definiert, welche durch acht entlang des gesamten Gens verteilte allelische Polymorphismen voneinander abgrenzbar sind (Rosskopf et al., 2002a). Aufgrund dieser Tatsachen erscheinen die zur Generierung von $G\beta_{3s}$ führenden Mechanismen des alternativen Spleißens plausibler: Man nimmt an, dass viele Basenaustausche, welche sich an verschiedenen Stellen des Gens befinden, die Sekundärstruktur der prä-mRNA in einer solchen Weise beeinflussen, dass die Generierung der Spleißvariante $G\beta_{3s}$ favorisiert wird. Auch die Entstehungsmechanismen von $G\beta_{3s2}$, der zweiten mit dem 825T-Allel assoziierten Spleißvariante von *GNB3*, sind bemerkenswert: Diese kurze $G\beta_3$ -Isoform weist eine Deletion von 129 Nukleotiden im Exon 10 auf, welche interessanterweise den C825T-SNP mit einschließt (Rosskopf et al., 2002b; s. Abb. 2.5). Am Spleißvorgang von $G\beta_{3s2}$ sind sogenannte „nicht-kanonische“ Motive beteiligt. Dies ist erwähnenswert, weil es sich hierbei um ein seltenes Ereignis handelt, welches bisher erst für wenige Gene, unter ihnen der menschliche Fc γ -Rezeptor 11A und das menschliche

Interleukin 15-Gen, beschrieben wurde (Bursat et al., 2001). Die durch diesen Spleißvorgang entstandene $G\beta_{3s2}$ -mRNA kodiert für das Protein $G\beta_{3s2}$, welches mit den bisher erhältlichen Antikörpern nicht von $G\beta_{3s}$ unterschieden werden kann. Das bedeutet: Im Westernblot wurde nachgewiesen, dass Zellen von T-Allel-Trägern kurze $G\beta_3$ -Isoformen exprimieren (Siffert et al., 1998), es ist aber bisher ungeklärt, ob es sich bei diesen um $G\beta_{3s}$ oder $G\beta_{3s2}$ oder um beide handelt (Roskopf et al., 2002b).

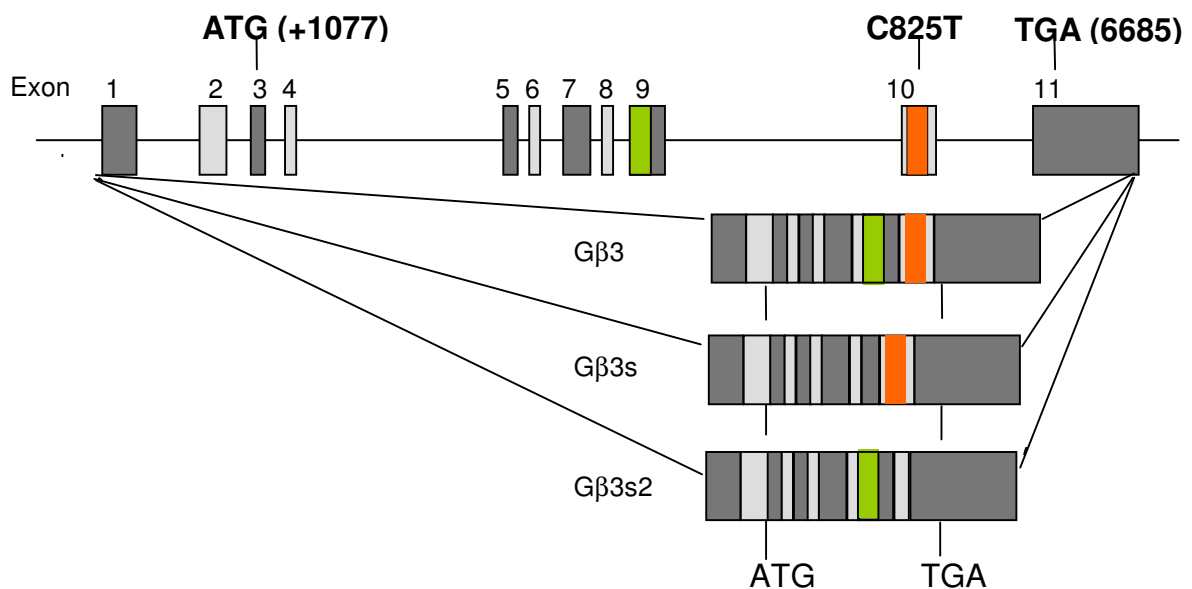


Abb. 2.5: Struktur des *GNB3*-Gens und Aufbau der durch alternatives Spleißen entstandenen Transkripte $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ (Abbildung mit freundlicher Genehmigung aus Roskopf et al., 2003)

Der obere Teil der Abbildung verdeutlicht die Struktur des aus 10 Exons und 11 Introns bestehenden *GNB3*-Gens; ihr unterer Teil zeigt schematisch den Aufbau der $G\beta_3$ -mRNA sowie der alternativen Spleißvarianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$. Die 11 Exons des *GNB3*-Gens sind als Balken, abwechselnd schwarz und grau eingefärbt, dargestellt. Die Positionen des Startkodons und des Stopkodons werden durch „ATG“ bzw. „TGA“ markiert, die Lage des C825T-Polymorphismus in Exon 10 ist angegeben. Die den Anfang von Exon 9 betreffende Deletion von $G\beta_{3s}$ ist grün, die Deletion von $G\beta_{3s2}$ in Exon 10 orange gefärbt dargestellt.

2.4. Physiologische und pathophysiologische Aspekte des *GNB3* C825T-Polymorphismus

Der C825T-Polymorphismus war in den letzten Jahren Gegenstand einer Vielzahl von klinischen Studien. Dabei fanden sich z.B. Assoziationen des 825T-Allels mit essentieller Hypertonie (z.B. Siffert et al., 1998; Dong et al., 1999), linksventrikulärer Hypertrophie (Poch et al., 2000), Schlaganfall (Morrison et al., 2001) und Adipositas (Siffert et al., 1999) sowie mit einem verstärkten Ansprechen auf antihypertensive und antidepressive Medikamente (Turner et al., 2001; Zill et al., 2000), um hier nur einige Ergebnisse zu nennen. Dieser großen Menge an Daten aus klinischen Untersuchungen steht gegenüber, dass die biochemischen und molekularen Vorgänge, welche zur Ausbildung dieses komplexen T-Allel-Phänotyps führen, noch nicht hinreichend geklärt werden konnten. Es gibt allerdings Hinweise darauf, welche Mechanismen bei seiner (Patho-)Genese möglicherweise bedeutsam sind:

Der *GNB3* C825T-Polymorphismus und $G\beta_{3s}$ wurden ursprünglich in Zellen gefunden, die aufgrund einer genetisch fixierten gesteigerten Signaltransduktion untersucht wurden. Hierbei hatte man festgestellt, dass diese verstärkte Signaltransduktion in Zellen von T-Allel-Trägern durch PTX-sensitive G-Proteine, nicht aber durch PTX-insensitive G-Proteine mediert wurde (Siffert et al., 1998). Daher lag es nahe, zu vermuten, dass $G\beta_{3s}$ (oder die neu gefundene Variante $G\beta_{3s2}$ oder beide) an der Genese des T-Allel-Phänotyps beteiligt sind. Des Weiteren ist aus Assoziationsstudien bekannt, dass Lymphozyten und Granulozyten von Trägern des T-Allels nach Stimulation von Rezeptoren, die an PTX-sensitive G-Proteine gekoppelt sind, eine gesteigerte Chemotaxis aufweisen (Virchow et al., 1998; Virchow et al., 1999) und dass ihre Thrombozyten nach Stimulation mit Adrenalin stärker aggregieren (Naber et al., 2000a). All diese Beobachtungen sind indirekte Hinweise darauf, dass die kurzen $G\beta_3$ -Varianten ursächlich an der verstärkten Aktivierbarkeit beteiligt sein könnten.

Auf den ersten Blick verwundert es allerdings, dass $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$, denen im Vergleich zum Wildtyp- $G\beta_3$ jeweils das Äquivalent einer gesamten WD-Domäne fehlt, biologisch aktiv sein sollen. Für ein tieferes Verständnis von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ ist es daher wichtig zu prüfen, ob diese trotz solcher beträchtlichen strukturellen Änderungen typische Charakteristika von $G\beta$ -Proteinen besitzen; hierzu zählen die folgenden drei wichtigen $G\beta$ -Eigenschaften:

- a) $G\beta$ -Proteine bilden mit $G\gamma$ -Untereinheiten Dimere. Hierbei scheint es deutliche Spezifitäten zu geben, d.h. nicht jedes $G\beta$ bildet gleich gut Dimere mit jedem $G\gamma$ aus (Clapham und Neer, 1997).

- b) Das entstandene G $\beta\gamma$ -Dimer interagiert mit einer entsprechenden G α -Untereinheit, wobei im Falle von G β_{3s} und G β_{3s2} die Interaktion mit PTX-sensitiven G α -Untereinheiten von hervorgehobener Bedeutung ist (s.o.).
- c) G $\beta\gamma$ -Dimere aktivieren eine Vielzahl von Effektorsystemen, als Beispiele seien hier die Phospholipase C β und die MAP-Kinase-Kaskade genannt (Clapham und Neer, 1997).

In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob G β_{3s} und G β_{3s2} die erste der drei genannten G β -Eigenschaften besitzen: Sind die beiden kurzen G β_3 -Isoformen in der Lage, stabile Dimere mit G γ -Untereinheiten auszubilden? Wenn dies der Fall ist: Zeigen sich dabei Spezifitäten und wenn ja: Welche?

Im Folgenden sollen nun kurz einige etablierte Methoden vorgestellt werden, die zur Beantwortung dieser Fragen angewandt werden können.

2.5. Methoden zur Untersuchung der G $\beta\gamma$ -Dimerbildung

Wie unter 2.2.2. erläutert wurde, ist rein rechnerisch eine Vielzahl verschiedener G $\beta\gamma$ -Kombinationen möglich. Diese Mannigfaltigkeit könnte entscheidend an der Ausbildung der Rezeptor-Effektorspezifität der Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine beteiligt sein. Andererseits wurde gezeigt, dass nicht alle theoretisch denkbaren G $\beta\gamma$ -Dimere auch tatsächlich vorkommen (Schmidt et al., 1992; Ray et al., 1995). Für die Untersuchung der Dimerisierung von G $\beta\gamma$ -Einheiten existiert mittlerweile eine Reihe etablierter Methoden:

- a) Eine der ersten Methoden zur Analyse von G $\beta\gamma$ -Dimerisierungen ist die durch **Pertussistoxin (PTX) katalysierte ADP-Ribosylierung** von G α -Untereinheiten in Anwesenheit definierter G $\beta\gamma$ -Dimere (Neer et al., 1984). Das Toxin von *Bordetella pertussis* hat die Eigenschaft einen ADP-Ribosylrest von einem Molekül Nikotinamiddinukleotid spezifisch auf einen Cystinrest am C-Terminus einer PTX-sensitiven G α -Untereinheit (G α_i , G α_o , G $\alpha_{\text{transduzin}}$ und G α_{gust}) zu übertragen. Diese Modifikation der G α -Untereinheit wird erheblich verstärkt, wenn G α *GDP ein biologisch aktives G $\beta\gamma$ -Dimer gebunden hat. Die ADP-Ribosylierung gibt also über den Nachweis der regelrechten Dimerbildung hinaus Auskunft darüber, ob das entstandene G $\beta\gamma$ -Dimer funktionell mit einer entsprechenden G α -Untereinheit interagieren kann.

- b) Weitere Methoden, welche zum Teil schon früh in der G-Protein-Forschung etabliert wurden, sind **funktionelle Untersuchungen**. Hierbei wird untersucht, ob bestimmte G $\beta\gamma$ -Dimere in der Lage sind mit typischen G $\beta\gamma$ -Effektorsystemen zu interagieren. Zu nennen wären hier z.B. die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade (Meloche et al., 1992) oder der Phospholipase C β (Dietrich et al., 1994).
- c) Bei der **limitierten Proteolyse durch Trypsin** macht man sich die Eigenschaft der G β -Untereinheit zunutze, dass sie im ungebundenen Zustand an vielen (im Falle von G β_1 an 32) Stellen durch Trypsin gespalten werden kann. Wenn sie jedoch einen regelrecht gefalteten Komplex mit einem geeigneten G γ ausgebildet hat, sind alle potentiellen Spaltungsstellen in dem dicht gepackten Propeller verborgen bis auf eine, nämlich das Arginin an Position 129, am Anfang der dritten WD-Domäne. Bei der Trypsinierung eines ordnungsgemäß gefalteten G $\beta\gamma$ -Dimers entstehen daher nur zwei Bruchstücke: ein instabiles N-terminales Fragment von ca. 14 kDa Größe und ein stabiles C-terminales Fragment von ca. 24 kDa Größe, dessen Nachweis in der SDS-PAGE als Beweis einer regelrechten Dimerbildung gilt (Thomas et al., 1993). Hierbei ist allerdings zu erwähnen, dass die Anwendung dieser Methode bisher im Wesentlichen auf Untersuchungen mit G β_1 und G β_2 beschränkt geblieben ist und dass Erfahrungen mit G β_3 fehlen.
- d) Bei der **Ko-Immunpräzipitation von HA-G $\beta\gamma$ -Dimeren** wird die Bildung von stabilen G $\beta\gamma$ -Dimeren dadurch nachgewiesen, dass im ersten Schritt ein Anti-HA-Antikörper ein an den N-Terminus des G γ artefiziell angehängtes Epitop, das sogenannte „HA-tag“, erkennt. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird im zweiten Schritt über Protein A-Agarose präzipitiert (s. Abb. 2.6). Bei dieser Prozedur wird jedes nicht fest an das HA-G γ gebundene G β herausgewaschen (Li et al., 1998).

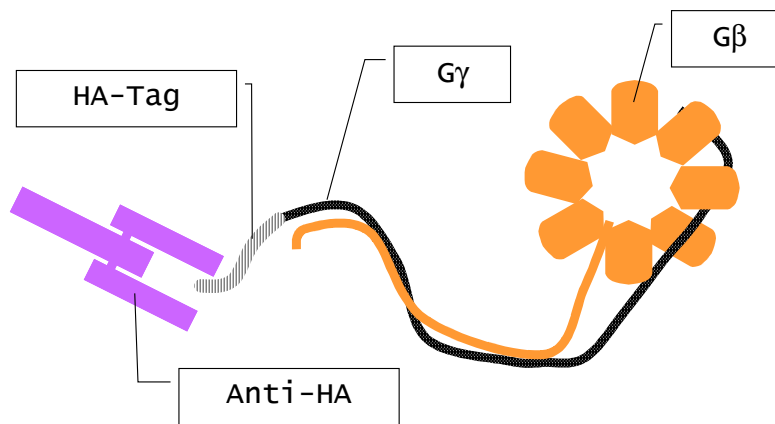


Abb. 2.6: Schemazeichnung eines AG-AK-Komplexes aus Anti-HA-AK und HA-G γ -G β -Dimer

Die Abbildung illustriert die unter d) vorgestellte Immunpräzipitationsmethode. Die G β -Untereinheit ist mit ihrer α -Helix und dem siebenblättrigen Propeller in orange dargestellt. Sie bildet ein Dimer mit einem in schwarz gezeigten G γ -Protein, welches N-terminal ein sogenanntes „HA-tag“ trägt (schraffiert). Dieses Nonapeptid stellt die antigene Determinante für den Anti-HA-Antikörper dar. So bilden das HA-G $\beta\gamma$ -Dimer (=Antigen) und der Anti-HA-Antikörper einen Antigen-Antikörper-Komplex (=AG-AK-Komplex), der über Protein A-Agarose präzipitiert werden kann (genauere Erläuterungen hierzu unter 3.11.).

- e) Bei der **Aufreinigung über Nickelsäulen** trägt einer der beiden Dimerisierungspartner, wahlweise das G γ - oder das G β -Protein, am N-Terminus ein aus sechs Histidinresten bestehendes Epitop, während der andere Partner in nicht-markierter Form vorliegt. Die in transfizierten Zellen gebildeten His-G $\beta\gamma$ -Dimere binden dann über das „His-Epitop“ an Nickelsäulen, und nicht-gebundenes Wildtyp-Protein wird bei den Waschvorgängen entfernt. Alternativ ist es möglich ein G α -Protein mit der Epitopmarkierung zu versehen und G-Protein-Heterotrimere aufzureinigen. Das G $\beta\gamma$ -Dimer gewinnt man dann, indem man es abschließend von der G α -Untereinheit trennt (Kozasa und Gilman, 1995).
- f) Bei der **yeast two-hybrid Methode** werden G β - und G γ -Untereinheit jeweils als Hybride mit zwei verschiedenen Domänen eines Transkriptionsfaktors in Hefezellen exprimiert. Wenn die beiden Partner miteinander interagieren, nähern sich die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors einander an. Dadurch sind sie in der Lage einen Promotor zu aktivieren, welcher in den Hefezellen die Aktivität des für das Enzym β -Galaktosidase kodierenden Reportergens kontrolliert. Die gemessene Enzymaktivität erlaubt dann

schließlich Rückschlüsse auf die Stärke der Interaktion von G β - und G γ -Untereinheit (Yan et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der G $\beta\gamma$ -Dimerbildung die unter d) genannte **Kopräzipitation von HA-G $\beta\gamma$ -Dimeren** angewandt. Mit ihr hat zuvor schon die Arbeitsgruppe E. Neer die Dimerisierung von mutierten G β_1 -Varianten mit G γ -Einheiten analysiert (Li et al., 1998). Die Methode besitzt den Vorteil, dass hierbei gleichzeitig eine Reihe verschiedener G β -G γ -Kombinationen untersucht werden kann. (Das Prinzip und die Durchführung der Immunpräzipitation werden ausführlich unter 3.11. erläutert.)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen,

- a) ob die beiden neu entdeckten G β_3 -Isoformen G β_{3s} und G β_{3s2} die Fähigkeit besitzen stabile Dimere mit G γ -Untereinheiten auszubilden, welches eine essentielle Eigenschaft von G β -Proteinen ist,
- b) ob sich dabei Spezifitäten erkennen lassen, wie sie für die G $\beta\gamma$ -Dimerisierung typisch sind, und
- c) für den Fall, dass sich Spezifitäten zeigen: mit welchen G γ -Isoformen die Interaktion bevorzugt wird und mit welchen G γ -Isoformen die Dimerbildung nur schwach bzw. gar nicht nachweisbar ist.

Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe von Immunpräzipitationsreihen für jede G γ -Isoform die Interaktion mit G β_{3s} und G β_{3s2} im Vergleich zu Wildtyp-G β_3 sowie zu G β_1 , G β_2 und G β_4 analysiert.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

3.1.1. Chemikalien und Feinchemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 40%	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Albumin, bovin	Sigma, Deisenhofen
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
m-Cresol	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamin-tetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Ficoll	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Roth, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma, Deisenhofen
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad, München
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Serva, Heidelberg
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

3.1.2. Radiochemikalien

[³⁵ S] L-Methionin (spezifische Aktivität 37 TBq/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
[³⁵ S] Met-Label (spezifische Aktivität > 37 TBq/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
([³⁵ S] Met-Label enthält 70 % [³⁵ S] Methionin und 25 % [³⁵ S] Cystein aus einem [³⁵ S] Hydrolysat aus <i>E. coli</i> .)	

3.1.3. Medium, Serum und Antibiotikazusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (=DMEM)

High Glucose 1x flüssig

PAA Laboratories, Linz,
Österreich

Fötale Rinderserum (FBS)

Sigma, Deisenhofen

Penicillin (100000 U/ml)/ Streptomycin (100000 µg/ml)

Sigma, Deisenhofen

3.1.4. Medium, Serum und Zusätze für die metabolische Markierung

DMEM ohne L-Arginin, L-Cystein, Glucose, L-Glutamin,

i-Inositol, L-Leucin, L-Methionin und NaH₂PO₄

Life Technologies, Karlsruhe

Fötale Rinderserum, dialysiert

Life Technologies, Karlsruhe

L-Arginin, flüssig, 12,46 g/l

Life Technologies, Karlsruhe

L-Glutamin, flüssig, 30 g/l

Life Technologies, Karlsruhe

i-Inositol, flüssig, 0,2 g/l

Life Technologies, Karlsruhe

L-Leucin, flüssig, 5,2 g/l

Life Technologies, Karlsruhe

3.2. Materialien für immunologische Untersuchungen

3.2.1. Erstantikörper

Anti-HA, monoklonal von der Maus, Klon 12CA5

Roche, Mannheim

Anti-HA (Y11), polyklonal vom Kaninchen

Santa Cruz Biotechnologies,
San Diego, CA, USA

Tetra-His-Antikörper, monoklonal von der Maus

Qiagen, Hilden

Anti-Gγ₁ (P-19), polyklonal vom Kaninchen

Santa Cruz Biotechnologies,
San Diego, CA, USA

3.2.2. Zweitantikörper

Anti-Maus-IgG, konjugiert mit Peroxidase

Sigma, Deisenhofen

Anti-Kaninchen-IgG, konjugiert mit Peroxidase

Sigma, Deisenhofen

Protein A-Agarose

Santa Cruz Biotechnologies,
San Diego, CA, USA

3.3. Konstrukte von G-Protein-Untereinheiten in pcDNA31⁺ bzw. pcDNA3

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über alle (HA-)G γ - und (His-)G β -Konstrukte, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für *in vitro*-Translation und Transfektion verwendet wurden.

Insert	Klonierungsstelle	Accession Number
Gγ- und HA-Gγ-Konstrukte		
G γ 1, human	<i>NotI</i> / <i>XhoI</i>	S62027
HA- G γ 1, human	<i>NotI</i> / <i>XhoI</i>	
G γ 2, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	M37183
HA-G γ 2, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G γ 3, bovin	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i>	M58349, M37182
HA-G γ 3, bovin	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i>	
G γ 4, human	<i>EcoRI</i>	U31382
HA-G γ 4, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G γ 5, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	M95779
HA-G γ 5, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G γ 7, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	M99393
HA-G γ 7, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G γ 8c, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	BTU20085
HA-G γ 8c, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G γ 10, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	U31383
HA-G γ 10, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G γ 11, human	<i>KpnI</i> / <i>XhoI</i>	U31384
HA-G γ 11, human	<i>KpnI</i> / <i>XhoI</i>	
G γ 12, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	U37561
HA-G γ 12, bovin	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G γ 13, human	<i>EcoRI</i>	H46116
HA-G γ 13, human	<i>HindIII</i> / <i>ApaI</i>	
Gβ- und His-Gβ-Konstrukte		
G β 1, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	X04526
His-G β 1, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G β 2, human	<i>EcoRI</i>	M36429
His-G β 2, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G β 3, human	<i>BamHI</i> / <i>NotI</i>	M31328
His-G β 3, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G β 3s, human	<i>BamHI</i> / <i>NotI</i>	Variante von M31328
His-G β 3s, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G β 3s2, human	<i>BamHI</i> / <i>NotI</i>	Variante von M31328
His-G β 3s2, human	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	
G β 4, murin	<i>EcoRI</i>	M87286

Tabelle 3.1: (HA-)G γ - und (His-)G β -Konstrukte, die bei der Transfektion und der *in vitro*-Translation eingesetzt wurden. Alle Konstrukte – mit Ausnahme von G β 1, welches in pcDNA3 kloniert war – waren in den Vektor pcDNA31⁺ kloniert.

3.4. Materialien für Molekularbiologische Untersuchungen

3.4.1. Materialien für die Bakterienkultur

LB Broth Base	Life Technologies, Karlsruhe
SOC-Medium	Life Technologies, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Sigma, Deisenhofen

3.4.2. Kommerzielle Kits für molekularbiologische Arbeiten

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel-Extraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Aufreinigungs-Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems	Promega, Madison, USA

3.4.3. Molekulargewichtsstandards

pBR322 DNA, geschnitten mit <i>Alu</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
--	------------------------------

3.4.4. Enzyme

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

3.4.4.1. Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Bsp</i> 120I	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Kpn</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Not</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Xho</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

3.4.5. Nukleotide

dNTP-Mix 10 mM (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

Promega, Madison, USA

3.4.6. Zugehörige Reaktionspuffer

Reaktionspuffer für die *Pfu*-DNA-Polymerase

Tris-Cl	20	mM
KCl	10	mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	mM
MgSO ₄	2	mM
Triton X-100	0,1	% (v/v)
BSA, nukleasefrei	0,1	mg/ml
pH 8,8		

Reaktionspuffer für die Superscript RNase H⁻ Reverse Transcriptase

Tris-Cl	50	mM
KCl	75	mM
MgCl ₂	3	mM
pH 8,3		

Reaktionspuffer für die T4 DNA-Ligase

Tris-Cl	66	mM
MgCl ₂	5	mM
DTT	1	mM
ATP	1	mM
pH 7,5 bei 20°C		

Rapid Ligation Buffer für Ligationen in den pGEM-T Easy Vektor

Tris-Cl	30	mM
MgCl ₂	10	mM
DTT	10	mM
ATP	1	mM
Polyethylenglykol	5	%
pH 7,8		

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym *EcoRI*

Tris-Cl	50	mM
MgCl ₂	10	mM
NaCl	100	mM
Triton X-100	0,02	% (v/v)

BSA	0,1	mg/ml
pH 7,5 bei 37°C		

Reaktionspuffer für die gleichzeitige Restriktion mit den Enzymen *Bsp120I* und *HindIII* bzw. *XhoI* und *KpnI* = 1x Y⁺/Tango-Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

Tris-Acetat	33	mM
Magnesiumacetat	10	mM
Kaliumacetat	66	mM
BSA	0,1	mg/ml
pH 7,9 bei 37°C		

Reaktionspuffer für die gleichzeitige Restriktion mit den Enzymen *BamHI* und *EcoRI* = 2x Y⁺/Tango-Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

Tris-Acetat	66	mM
Magnesiumacetat	20	mM
Kaliumacetat	132	mM
BSA	0,1	mg/ml
pH 7,9 bei 37°C		

Reaktionspuffer für die gleichzeitige Restriktion mit den Enzymen *BamHI* und *NotI* bzw. *NotI* und *XhoI* = *Orange Buffer* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

Tris-Cl	50	mM
MgCl ₂	10	mM
NaCl	100	mM
BSA	0,1	mM
pH 7,5 bei 37°C		

Die jeweiligen Puffer wurden fertig von den entsprechenden Herstellern bezogen.

3.4.7. Vektoren

pGEM-T Easy	Promega, Madison, USA
pcDNA31 ⁺	Invitrogen, Carlsbad, USA

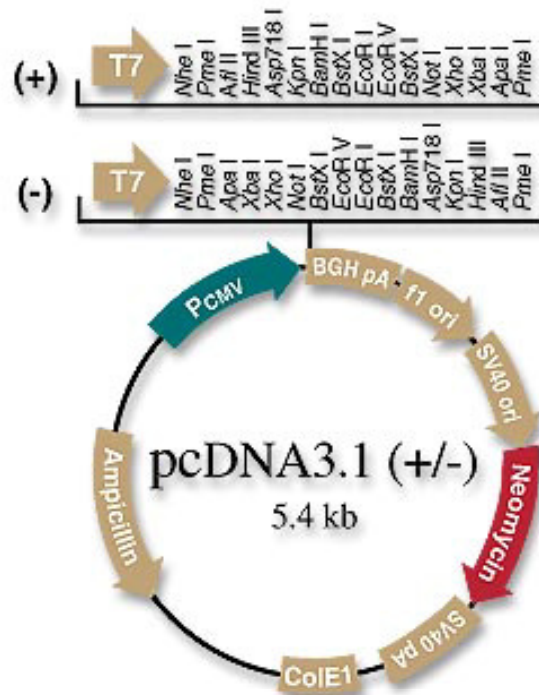


Abb. 3.1: Vektorkarte des Expressionsvektors pcDNA31⁺

Der Vektor pcDNA31⁺ ist ein Expressionsvektor für Mammalierzellen. Für die Selektion in Bakterien besitzt er ein Ampicillinresistenzgen. Das zu exprimierende Konstrukt steht unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors. Außerdem besitzt dieser Vektor ein Neomycinresistenzgen und eignet sich daher auch für die Herstellung stabil transfizierter Zellen.

3.4.8. Oligonukleotidprimer

Oligo p(dT)₁₅ für die cDNA-Synthese

Roche, Mannheim

3.4.8.1. Primer aus der Sequenz des pGEM-T Easy-Vektors

Life Technologies,
Karlsruhe

Alle folgenden Oligonukleotidprimer wurden als Auftragssynthese im 50 nmol-Maßstab von Life Technologies durchgeführt und wurden entsalzt geliefert.

pGEM_T7:	5`-TAATACGACTCACTATAGGGCG-3`
pGEM_SP6:	5`-TTAGGTGACACTATAGAATAC-3`

3.4.8.2. Primer aus der Sequenz des pcDNA31-Vektors

Life Technologies,
Karlsruhe

pcDNA31_SE	5`-GACTCACTATCGGGAGACCC-3`
pcDNA31_AS:	5`-ACTAGAAGGCACAGTCGAGG-3`

3.4.8.3. Individuelle Gγ-Primer: s. Tabelle 3.2

Life Technologies,
Karlsruhe

Der Aufbau aller verwendeten HA-Gγ-Primer ist im Prinzip gleich und wird hier am Beispiel des Gγ5_HA_S-Primers dargestellt:

BamHI Kozak HA-tag-Sequenz Gγ5-Sequenz
 5`-GC-GGATCCACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCC-TCTGGTTCATCCAGCGTCGC-3`

Die modifizierten Primer enthalten die HA-tag-Sequenz, auf die unmittelbar die N-terminale Sequenz der jeweiligen Gγ-Isoform folgt. Direkt vor der Kozak-Sequenz ist eine künstliche Restriktionsstelle eingebaut. (Unter Kozak-Sequenz versteht man eine kurze Nukleotidsequenz in unmittelbarer Nachbarschaft des dem Startkodon entsprechenden ATG in der DNA, die bei Mammaliern die Effizienz der Translationsinitiation erhöht.) Die zwei Basen GC vor der Restriktionsstelle („Clamp“) sollen eine optimale Restriktion gewährleisten, d.h. es soll der Restriktionsstelle eine ausreichende Bindung an die DNA ermöglicht werden.

Bezeichnung des Primers	Sequenz des Primers
Gγ1_HA_S	5`-GCGCGGCCGACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCCCAGTGATCAATATTGAGGAC-3`
GG1AS_XHO1	5`-CGCGCTCGAGTTATGAAATCACACAGCC-3`
Gγ2_HA_S	5`-GCGGATCCACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCAGCAACAACACCGCCAGC-3`
Gγ3_HA_S	5`-GCGAAGCTTACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCAAAGGGGAGACCCCTGTGAACAG-3`
Gγ4_HA_S	5`-GCGGATCCACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCAAAGAGGGCATGTCTAATAAC-3`

Gγ5_HA_S	5`-GCGGATCCACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACG-CCTCTGGTTCATCCAGCGTCGC-3`
Gγ7_HA_S	5`-GCGGATCCACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACG-CCTCAGCCACTAACAACATAGC-3`
Gγ8c_HA_S	5`-GCGATCCACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGC-CCAAGAGCTCAGCGAGAAG-3`
Gγ8_Eco	5`-CGCGGAATTCTCAGCTTATTATACAACCGCC-3`
Gγ10_HA_S	5`-GCGGATGGACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTAC-GCCTCCTCCGGGGCTAGCGCGAG-3`
Gγ1010ECO	5`-CGCGGAATTCTGCTTGAAGGCATTAATCAGC-3`
Gγ11_HA_S	5`-GCGGGTACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCC-CCTGCCCTTCACATCGAAGATTTG-3`
Gγ11_Xho	5`-GCGCCTCGAGTTATGAAATAACACAGCTGCC-3`
Gγ12_HA_S	5`-GCGGATCCACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACG-CCTCGAGCAAGACAGCCAGTAC-3`
Gγ12_Eco	5`-CGCGGAATTCTCTATAAGATGGTGCAGGTC-3`
hGγ13_SE1	5`-CCCTGACCCCATGGAGGAGTGGGACGTGCCACAGATGAAG-3`
hGγ13_AS2	5`-GGCTCACAGGATGGTGCATTT-3`
HA_Gγ13_SE	5`-GCGGATCCACCATGGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACG-CCGAGGAGTGGGACGTGCCACAG-3`
HA_13_2	5`-GCAAGCTTACCATGGCCTACCCCTACGACG-3`

Tabelle 3.2: Primer für die Herstellung von HA-Gγ-Konstrukten und für die Klonierung von Gγ₁₃

3.4.8.4. Individuelle Gβ-Primer: s. Tabelle 3.3

Life Technologies,
Karlsruhe

Auch der Aufbau der His-tag-Primer folgte immer dem gleichen Prinzip und wird hier am Beispiel des B3HIS-Primers vorgestellt:

BamHI Kozak His-tag-Sequenz (6 x His) Gβ₃-Sequenz
 5'-GC-GGATCCACCATGGCT-CAC-CAC-CAT-CAC-CAT-CAC-GGGGAGATGGAGCAACTGCG-3'

Bezeichnung des Primers	Sequenz des Primers
B1HIS	5'-GCGGATCCACCATGGCTCACCACCATCACCATCACTCAGAG-CTTGACCAGTTACG-3'
Gb1_Eco	5'-GCGCGAATTCCACATGCTACTGGCGTTAG-3'
B2HIS	5'-GCGGATCCACCATGGCTCACCACCATCACCATCACAGTGAG-CTGGAGCAACTGAG-3'
B3HIS	5'-GCGGATCCACCATGGCTCACCACCATCACCATCACGGGGAG-ATGGAGCAACTGCG-3'
B3A_Eco	5'-GCTGTGGCCACAGGTTCTGGGAACAGATTCCTCAAAATCT-GGAACTGAGGAGGCTGGAGA-3'
B4HIS	5'-GCGGATCCACCATGGCTCACCACCATCACCATCACAGCGAG-CTGGAGCAGCTGAGGCAG-3'
B4AS_ECO	5'-TCAATTCCAGATTCTAAGAAAAC-3'

Tabelle 3.3: Primer für die Herstellung von His-Gβ-Konstrukten

3.5. Filter- und Blotpapier

Whatman Chromatographiepapier 3 MM Ch
 Nitrozellulose Transfermembran Protran,
 Porengröße 0,45 µm
 Nitro Plus, Supported,
 Porengröße 0,22 µm

Biometra Whatman, Göttingen

Schleicher & Schuell, Dassel

Micron Separations, Minnetonka,
 USA

3.6. Puffer, Lösungen und Medien

3.6.1. Häufig verwendete Puffer- und Waschlösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (PBS)

NaCl	137	mM
KCl	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	4,3	mM
KH ₂ PO ₄	1,4	mM
pH 7,0		

3.6.2. Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer (5x)

Tris-HCl	445	mM
Borsäure	445	mM
EDTA	10	mM
pH 8,0		

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung

Ethidiumbromid in H ₂ O	1	mg/ml
------------------------------------	---	-------

Elektrophoresepuffer

TBE-Puffer 0,5-fach mit 1 mg/l Ethidiumbromid

DNA-Auftragspuffer (5x)

Ficoll	25	% (w/v)
Bromphenolblau	0,5	% (w/v)
Xylencyanol	0,5	% (w/v)

3.6.3. Medien für die Zellkultur

Zellkulturmedium für HEK-TSA und HEK 293

DMEM 1x flüssig		
FKS	10	% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1	% (v/v)

Mangelmedium für die metabolische Markierung

DMEM ohne L-Arginin, L-Cystein, Glukose, L-Glutamin,
i-Inositol, L-Leucin, L-Methionin und Natriumphosphat

Fötale Rinderserum, dialysiert	10	% (v/v)
L-Arginin, flüssig	1	% (v/v)
L-Glutamin, flüssig	1	% (v/v)
i-Inositol, flüssig	1	% (v/v)
L-Leucin, flüssig	1	% (v/v)
Glukose	45	g/l
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	1,2	g/l

3.6.4. Puffer zur Herstellung von Zelllysaten

PMSF-Stammlösung

PMSF in Isopropanol	100	mM
---------------------	-----	----

Lagerung bei 4°C

Waschpuffer

Tris-Cl, pH 7,5	20	mM
EDTA	1	mM

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert. Etwa 30 min vor der Verwendung wurden die folgenden Proteaseinhibitoren bzw. Supplemente in der genannten Endkonzentration zugefügt:

DTT	1	mM
Benzamidin	3	mM
Soybean Trypsin Inhibitor	2	mg/ml
PMSF	1	mM

PMSF wurde unter starkem Rühren zugegeben und der Puffer bis zur Verwendung auf Eis gestellt.

Lysepuffer

HEPES-Na, pH 7,5	50	mM
MgCl ₂	6	mM
Saccharose	75	mM
EDTA	1	mM
(Für Lysepuffer mit NaCl zusätzlich:		
NaCl	150	mM)

Am Versuchstag werden dazugegeben:

Triton X-100	1	% (v/v)
Benzamidin	3	mM

DTT	1	mM
-----	---	----

3.6.5. Radio-Immuno-Precipitation-Assay- (RIPA-)Puffer

Tris-Cl, pH 7,6	25	mM
NaCl	150	mM
EDTA	4	mM
SDS	0,1	% (w/v)
Deoxycholat	0,5	% (w/v)
Igepal CA 630	1	% (v/v)

3.6.6. Lösungen und Puffer für die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen und den Elektrotransfer

Sammelgelpuffer

Tris-Cl	0,5	M, pH 6,8
---------	-----	-----------

8-fach Trenngelpuffer

Tris-Cl	3	M, pH 8,8
---------	---	-----------

APS-Lösung

APS	10	% (w/v)
-----	----	---------

SDS-Lösung

SDS	10	% (w/v)
-----	----	---------

Verschlussgelmischung für zwei Gele

8-fach Trenngelpuffer	3	ml
Acryl-/Bisacrylamid 40 % (29:1)	3	ml
APS 10%	30	µl
TEMED	30	µl

Trenngelmischung für ein 8-20%iges Gradientengel

-20%ige Mischung

Acryl-/Bisacrylamid 40 % (29:1)	10	ml
8-fach Trenngelpuffer	2,5	ml
H ₂ O	7,22	ml

SDS 10%	0,2	ml
Saccharose	3	g
APS 10%	70	μl
TEMED	7	μl

-8%ige Mischung

Acryl-/Bisacrylamid 40% (29:1)	4	ml
8-fach Trenngelpuffer	2,5	ml
H ₂ O	13,22	ml
SDS 10%	0,2	ml
APS 10%	70	μl
TEMED	7	μl

Trenngelmischung für ein 15%iges Trenngel

Acryl-/Bisacrylamid 40% (29:1)	15	ml
8-fach Trenngelpuffer	5	ml
H ₂ O	19,4	ml
SDS 10%	400	μl
APS 10%	140	μl
TEMED	14	μl

Sammelgelmischung für zwei Gele

Acryl-/Bisacrylamid 40% (29:1)	2,55	ml
Sammelgelpuffer	2,5	ml
H ₂ O	14,55	ml
SDS 10%	200	μl
APS 10%	200	μl
TEMED	20	μl

SDS-Probenpuffer nach Laemmli, 3-fach konzentriert

Für 10 ml:

SDS 20 %	3	ml
Glycerol	3	ml
Tris-Cl 1 M, pH 6,8	1,8	ml
H ₂ O	2,2	ml
β-Mercaptoethanol	300	μl
Bromphenolblau	10	mg

Beim Ansetzen von 3-fach *Purple Red Buffer* für HA-Gγ-Proben werden dem SDS-Probenpuffer als Farbstoff anstelle des Bromphenolblaus 10 mg m-Cresol hinzugefügt.

Bromphenolblau läuft in Höhe der G γ -Bande, während m-Cresol in seinem Laufverhalten einem noch niedrigeren Molekulargewicht entspricht.

Elektrophoresepuffer (Laufpuffer)

Tris-Cl, pH 8,3	25	mM
Glycin	192	mM
SDS	0,1	% (w/v)

Anodenpuffer für G γ -Gele

Tris	25	mM
Glycin	192	mM
Natriumacetat	100	mM

Transferpuffer

Tris	25	mM
Glycin	192	mM
Methanol	20	% (v/v)

Ponceau S Färbelösung für Nitrozellulosefilter

Ponceau S	0,2	% (w/v)
Trichloressigsäure	3	% (w/v)
Sulfosalicylsäure	3	% (w/v)

3.6.7. Lösungen für den Westernblot mit Anti-G β common-, Anti-G γ - und Anti-HA-Antikörpern

TBS (*tris-buffered saline*)

Tris-Cl, pH 8	10	mM
NaCl	150	mM

Waschlösung A

TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20

Blocklösung = Blotto A

Waschlösung A mit 5 % (w/v) Magermilchpulver

Antikörperverdünnungslösung

TBS mit 1 % (w/v) BSA

3.6.8. Lösungen für den Westernblot mit dem Tetra-His-Antikörper

TBS

Tris-Cl, pH 7,5	10	mM
NaCl	150	mM

TBS Tween/Triton

Tris-Cl, pH 7,5	20	mM
NaCl	500	mM
Tween 20	0,05	% (v/v)
Triton X-100	0,2	% (v/v)

Blocklösung = Verdünnungslösung für den Erstantikörper

TBS mit 3 % (w/v) BSA

Verdünnungslösung für den Zweitantikörper

TBS mit 10 % (w/v) Magermilchpulver

3.7. Zellkultur

3.7.1. Kultur der HEK 293- und HEK-TSA-Zellen

HEK-Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen mit fibroblastärem Charakter. HEK-TSA Zellen sind mit dem *large T-antigen* des SV40 Virus stabil transfiziert. Sie können deshalb nach Transfektion mit Expressionsplasmiden, die den *origin of replication* des SV40 Virus tragen (wie es bei pcDNA31⁺ der Fall ist), zunächst den Vektor amplifizieren, bevor die Zelle mit der Synthese des durch den Vektor kodierten Proteins beginnt. Ihre Expressionsrate ist dadurch gegenüber HEK 293-Zellen, die nicht stabil transfiziert sind, gesteigert.

Die Zellen wurden in DMEM Flüssigmedium mit 10% (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C in 95% wassergesättigter Raumluft mit einem Zusatz von 5% CO₂. Die HEK 293-Zellen wurden in 250 ml-Flaschen gehalten und zweimal pro Woche passagiert, während HEK-TSA-Zellen auf 6-Loch-Platten kultiviert wurden und dreimal pro Woche im Verhältnis 1 : 4 passagiert wurden.

Die Zellen wurden regelmäßig auf bakterielle oder fungale Kontaminationen untersucht. Alle Zellkulturarbeiten wurden in Steriltechnik in einer Reinraumwerkbank durchgeführt

3.7.2. Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin

Um zu verhindern, dass sich die HEK-TSA-Zellen bei den Waschschritten ablösen, wurden die Zellkulturschalen bei Transfektionsuntersuchungen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierbei wurden 5 ml der gelieferten Lösung (Sero-med, Berlin) mit 35 ml H₂O gemischt, steril filtriert und bei 4°C gelagert. Vor der Aussaat der Zellen wurden dann pro Loch einer 6-Loch-Platte 1 ml und pro 6 cm-Platte 2 ml der Gebrauchslösung auf die zu beschichtende Fläche gegeben, so dass der Boden gleichmäßig bedeckt wurde. Nach 25 min wurde die Flüssigkeit wieder abgesaugt.

3.8. Bakterienkultur

3.8.1. Zubereitung von LB-Medium für die Bakterienkultur

Für 1 l Medium wurden 20 g LB Broth Base in Pulverform in 1 l H₂O gelöst und über 20 min bei 121°C in feuchter Hitze autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden dem Medium 60 mg Ampicillin zugesetzt. Das fertige, antibiotikahaltige LB-Medium konnte nun unter sterilen Bedingungen in 100 ml-Portionen in 500 ml-Erlenmeyer-Kolben aufgeteilt werden, um anschließend mit *E. coli* beimpft zu werden, wie unter 3.8.3. beschrieben.

3.8.2. Herstellung von Agarplatten

15 g Agarose und 20 g LB Broth Base-Pulver wurden in 1 l H₂O gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C wurden 60 mg Ampicillin hinzugefügt und die visköse Flüssigkeit unter sterilen Bedingungen auf 10 cm-Petrischalen gegossen.

3.8.3. Kultur von *E. coli*

Ein Klon von transformierten *E. coli* wurde unter sterilen Bedingungen von einer Agarplatte gepickt und eine Bakterienkultur in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Nach sechsstündiger Bebrütung bei 37°C und 175 rpm im Warmluftschüttler wurden, um Material für eine Plasmidpräparation zu gewinnen, 200 µl der Zellsuspension in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben und in einer Übernachtskultur angezüchtet (16-stündige Inkubation bei 37°C und 175 rpm im Warmluftschüttler).

3.9. Molekularbiologische Methoden

3.9.1. Allgemeine molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.9.1.1. Spektralphotometrische Messungen

Zur Bestimmung der Konzentration präparierter DNA bzw. RNA in wässriger Lösung wurde deren Absorption bei $\lambda = 260$ nm in einer Quartzküvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Hierbei wurde ein Ultrospec II-Spektralphotometer der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet.

Die Konzentration wurde mit den folgenden Formeln berechnet:

1 Absorptionseinheit A_{260} entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngige DNA

1 Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$ für RNA

Mit dem Quotienten A_{260}/A_{280} wurde die Reinheit der Nukleinsäuren abgeschätzt. Der Wert bewegte sich bei den Messungen zwischen 1,6 und 1,8 und beträgt im Idealfall 2.

3.9.1.2. Herstellung eines 1,5-prozentigen Agarosegels für die Elektrophorese

Für ein kleines Agarosegel (6,5 cm x 9 cm) wurden 0,75 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer 0,5x gegeben, in der Mikrowelle ca. 2 min lang aufgekocht und anschließend mit 5 μl Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (entsprechend 5 μg Ethidiumbromid) vermischt. Nach Abkühlung auf 50°C wurde die Mischung in einen Gelträger gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Dieser wurde nach dem Aushärten wieder entfernt und das Gel in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Kammer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit H_2O auf ein Volumen von 10 μl verdünnt und mit jeweils 3 μl Auftragspuffer vermischt. Anschließend wurden die Proben sowie der Größenmarker pBR322 DNA/*Alu*I (für den Bereich von 100 - 908 bp) in die entsprechenden Taschen aufgetragen und bei 80 V ca. 90 min lang elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden im UV-Licht durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht durch ein Sofortbild dokumentiert.

3.9.1.3. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* mit dem pGEM-T Easy- oder dem pcDNA31⁺-Vektor wurde der kommerziell erhältliche JM 109 *E. coli*-Stamm (Promega) verwendet. Durch eine spezielle Präparation können diese „kompetenten“ Zellen Plasmide aufnehmen.

Die bei -70°C gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in sterile Mikroreaktionsgefäße á 20 μl aliquotiert. Anschließend wurden je 5 - 7 μl des Ligationsansatzes zugegeben und untergemischt und die Bakterien bei 4°C 30 min lang inkubiert. Abschließend wurden die Zellen exakt 40 sec lang einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Die Bakterien wurden kurz auf Eis abgekühlt, anschließend mit je 80 μl SOC Medium versetzt und 1 h lang bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. In dieser Zeit waren die Bakterien in der Lage ihre Antibiotikaresistenz zu exprimieren, so dass durch Ausstreichen auf LB-Platten mit Ampicillin und Bebrütung bei 37°C über eine Zeit von 16 h die Antibiotikaselektion durchgeführt werden konnte.

3.9.1.4. Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit durchgeführt, welches nach dem Prinzip der Anionenaustauschchromatographie arbeitet. Als Ausgangsmaterial wurden 100 ml einer Übernachtskultur von *E. coli*, die mit dem entsprechenden Plasmid transformiert worden waren, verwendet. Die Plasmid-DNA wurde abschließend in 100 μl H_2O aufgenommen und ihre Konzentration spektralphotometrisch bestimmt. Um zu bestätigen, dass der präparierte Vektor das richtige Insert enthielt, wurde eine Probe des erhaltenen Plasmids von 1 μg mit den Restriktionsenzymen, über deren Restriktionsstellen das Insert in den Vektor kloniert worden war, geschnitten. Anschließend erfolgte die Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese. Durch Vergleich mit dem pBR322 DNA/*AluI*-Marker geprüft, ob die entstandenen Fragmente die erwartete Größe besaßen.

3.9.2. Polymerase-Kettenreaktion

3.9.2.1. Allgemeines zur Polymerase-Kettenreaktion (=PCR)

Mit der PCR kann ein definierter DNA-Abschnitt in einer DNA-Probe mit Hilfe von zwei synthetischen Oligonukleotiden (= Primern), welche die gesuchte Sequenz flankieren, und der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert werden.

Im ersten Schritt wird die DNA bei 95°C in Einzelstränge getrennt (=Denaturierung), im zweiten Schritt bei 55 - 65°C lagern sich die Primer an ihre Zielsequenzen an (=Annealing). Im dritten Schritt bei 72°C beginnt die *Taq*-Polymerase, ausgehend von den kurzen doppelsträngigen DNA-Abschnitten im Primerbereich, die Synthese des komplementären DNA-Stranges (=Elongation). Der PCR-Zyklus wird 25 - 35 mal wiederholt.

3.9.2.2. PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase

Für die hier durchgeführten PCR-Klonierungen wurde statt der üblichen *Taq*-Polymerase die thermostabile DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Diese DNA-Polymerase besitzt eine 3' – 5' Exonuklease-Aktivität und kann damit die Richtigkeit des neu synthetisierten DNA-Stranges überprüfen bzw. korrigieren („*proofreading*“). Damit weist diese Polymerase eine deutlich niedrigere Fehlerrate auf als gewöhnliche *Taq*-Polymerasen.

PCR-Ansatz:	5	µl	10x PCR-Puffer
	1	µl	dNTP (Endkonz.: 200 µM)
	1	µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (=25 U)
	2	µl	<i>sense</i> -Primer (10 pmol/l)
	2	µl	<i>antisense</i> -Primer (10 pmol/l)
	34	µl	H ₂ O
	5	µl	Matrize (darin enthalten: 0,5 µg DNA oder das Produkt der cDNA-Synthese)
	50	µl	

Temperatur-Zeit-Profil:

- für Gy-Proteine: 1.) 95°C 2 min
2.) 95°C 1 min
60°C 45 sec
72°C 1 min
Dieser Zyklus wurde 35mal durchgeführt.
3.) 72°C 5 min
- für Gβ-Proteine: 1.) 95°C 2 min
2.) 95°C 1 min
58°C 45 sec
72°C 4 min
Dieser Zyklus wurde 35mal durchgeführt.
3.) 72°C 10 min

Anschließend wurden 2 µl des PCR-Produktes in einem Agarosegel aufgetrennt, um durch Größenvergleich mit dem pBR322 DNA/*AluI*-Marker zu kontrollieren, ob das Produkt die erwartete Größe aufwies.

3.9.2.3. „Klon-PCR“ zum Nachweis rekombinanter Transformanten

Um sogenannte positive Klone, d.h. Klone, welche das gewünschte Insert tragen, zu identifizieren, wurde eine „Klon-PCR“ durchgeführt. Von einer Agarplatte, auf der transformierte *E. coli* ausgestrichen und bebrütet worden waren, wurden einige Klone gepickt. Mit dem gewonnenen Material wurde zum einen eine Bakterienkultur in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und unter den unter 3.8.3. angegebenen Bedingungen bebrütet und zum anderen eine PCR unter den unten genannten Bedingungen durchgeführt. Das hierbei verwendete *Taq* PCR Mastermix (Qiagen) enthält eine *Taq*-DNA-Polymerase, dNTP und einen geeigneten Puffer.

PCR-Ansatz:	25	μl	<i>Taq</i> PCR Mastermix
	2	μl	<i>sense</i> -Primer (10 pmol/l)
	2	μl	<i>antisense</i> -Primer (10 pmol/l)
	21	μl	H ₂ O
	50	μl	
+ eine kleine Menge Material aus der Bakterienkolonie			

Temperatur-Zeit-Profil:

1.)	95°C	5	min
2.)	95°C	1	min
	58°C	1	min
	72°C	1	min

Dieser Zyklus wurde 35mal durchgeführt.

3.)	72°C	10	min
-----	------	----	-----

5 μl der Reaktion wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Vergleich mit dem pBR322 DNA/*Alu*I-Marker wurden die Klone mit einem Insert der gewünschten Größe identifiziert. Von den positiven Klonen wurde dann eine 100 ml-Übernachtskultur angesetzt, wie unter 3.8.3. beschrieben, die am nächsten Morgen als Ausgangsmaterial für die Plasmidpräparation (s. 3.9.1.4.) diente.

3.9.3. Klonierung von $G\gamma_{13}$ und Herstellung von $G\gamma_{13}$ in pcDNA31⁺

Im Verlaufe dieser Promotionsarbeit wurde die Sequenz einer weiteren $G\gamma$ -Isoform, $G\gamma_{13}$, veröffentlicht. Trotz mehrfacher Nachfragen wurde uns leider der entsprechende Klon nicht zur Verfügung gestellt. Wir haben daher selbst $G\gamma_{13}$ kloniert, um damit die weiteren Versuche durchführen zu können.

3.9.3.1. RNA-Präparation

G γ ₁₃ wird unter anderem im Gehirn und in der Retina exprimiert (Huang et al., 1999). Als Ausgangsgewebe für die RNA-Präparation dienten deshalb menschliches Hirn und Retinoblastomzellen.

Die Gehirnproben bzw. die Retinoblastomzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in diesem Zustand in einem Mörser fein zerrieben. Nach Zugabe des Guanidin-Isothiocyanat-haltigen RLT-Puffers (Qiagen) wurden sie anschließend mit einem schnell rotierenden Messer (Ultra-Turrax; Janke und Kunkel, Staufen) weiter homogenisiert. Die RNA-Präparation aus dem Homogenisat wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen nach dem Protokoll für tierisches Gewebe bzw. tierische Zellen durchgeführt. Abschließend wurde die RNA in H₂O eluiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

3.9.3.2. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden zunächst 3 µg RNA 5 min lang bei 70°C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie in einem Gesamtvolumen von 60 µl 1x *First Strand Buffer* mit 1,2 µg Oligo p(dT)₁₅, je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 10 mM DTT gemischt. Zum Schluss wurden 600 U SuperScript RNaseH⁻ RT hinzugefügt. Dieses Enzym wird von einem klonierten Gen für die Reverse Transkriptase des M-MLV (*moloney murine leukemia virus*) hergestellt, dessen RNaseH-Aktivität deletiert wurde. Dadurch hat das Enzym seine Fähigkeit verloren, den mRNA-Strang des mRNA-cDNA-Hybridmoleküls abzubauen, welches bei der Synthese des zur mRNA komplementären cDNA-Stranges durch die Reverse Transkriptase gebildet wird. Ein mRNA-Molekül kann somit als Matrize für viele cDNA-Moleküle dienen. Die cDNA-Synthese fand bei 37°C über eine Zeitdauer von 60 min statt. Danach wurde das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert.

3.9.3.3. PCR des Produktes der Reverse Transkriptase-Reaktion

Mit der gewonnenen cDNA wurde eine PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (Bedingungen s. 3.9.2.2.) und den Primern hG γ ₁₃_SE und hG γ ₁₃_AS durchgeführt.

3.9.3.4. Ligation und Klonierung von G γ ₁₃ in pGEM-T Easy

Die PCR-Produkte sollten im nächsten Schritt in den Vektor pGEM-T Easy, der speziell für die Klonierung von PCR-Produkten entwickelt worden ist, kloniert werden. Dieser wurde bereits vom Hersteller linearisiert und besitzt an seinen Enden überhängende Deoxythymidin-Reste. Die gewöhnliche *Taq*-Polymerase besitzt die Eigenschaft, an die amplifizierten PCR-

Produkte in 3'-Richtung noch Deoxyadenosine anzuhängen. Diese Reste können sich dann an die Deoxythymidinreste des Vektors anlagern. Leider besitzt die *Pfu*-Polymerase diese Eigenschaft nicht. Daher wurde in einem ersten Schritt ein sogenanntes „*A-tailing*“ durchgeführt, d.h. überhängende Deoxyadenosine wurden unter Verwendung einer handelsüblichen *Taq*-Polymerase an das PCR-Produkt angefügt.

Hierzu wurden die PCR-Produkte 20 min lang auf 95°C erhitzt und dann bei 80°C 2,4 µl dATP (10 mM) und 4 U *Taq*-Polymerase ohne *proofreading*-Funktion hinzugefügt. Nach Abkühlen auf 70°C wurde der Ansatz bei dieser Temperatur weitere 5 min lang inkubiert.

Anschließend erfolgte die Ligation in den pGEM-T Easy-Vektor.

Ligationsansatz:	5	µl	<i>Rapid Ligation Buffer</i> (2x)
	1	µl	Vektor pGEM-T Easy (50 ng)
	2	µl	<i>A-tailing</i> -Produkt
	1	µl	T4 DNA-Ligase (3 U)
	1	µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur 60 min lang inkubiert.

Anschließend erfolgte die Transformation des Ligationsproduktes in kompetente *E. coli*. Mit einer Klon-PCR unter Verwendung der Primer pGEM_T7 und pGEM_SP6 wurden positive Klone identifiziert. Es schlossen sich die Anzucht eines positiven Klon und die Plasmidpräparation an. Der Vektor wurde unter Verwendung eines T7-Primers vom Sequenzierservice des Universitätsklinikums Essen sequenziert und die Sequenz wurde auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.9.3.5. Herstellung von G γ ₁₃ in pcDNA31⁺

Um G γ ₁₃ in den Expressionsvektor pcDNA31⁺ zu klonieren, wurde eine Restriktion von G γ ₁₃ in pGEM-T Easy mit *Eco*RI durchgeführt. Das gesamte Reaktionsprodukt wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, die durch UV-Licht sichtbar gemachte G γ ₁₃-Bande ausgeschnitten und mit dem QIAEX II Gel-Extraktionskit (Qiagen) aufgereinigt. Der pcDNA31⁺-Vektor wurde ebenfalls mit *Eco*RI geschnitten und mit Alkalischer Phosphatase behandelt (s. 3.9.4.2.). Es schlossen sich die Ligation des G γ ₁₃ in den Vektor (s. 3.9.4.3.) und die Transformation in JM 109-Zellen an. Durch zwei Klon-PCR-Analysen mit den Primern hG γ 13_SE1 und pcDNA_AS bzw. pcDNA31_SE und pcDNA31_AS wurden die Klone mit einem Insert der gewünschten Größe und Orientierung identifiziert. Einer dieser Klone wurde angezüchtet und eine Plasmidpräparation durchgeführt.

3.9.4. Epitope Tagging von G γ - und G β -Proteinen durch PCR-Mutagenese mit HA-tag- bzw. His-tag-Primern

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die Durchführung der Immunpräzipitationsuntersuchungen sowohl Konstrukte der verschiedenen G γ -Isoformen mit N-terminalem HA-Epitop als auch Konstrukte verschiedener G β -Isoformen mit N-terminalem His-Epitop in pcDNA31⁺ hergestellt.

Der Prozess der Fusionierung eines zu untersuchenden Proteins mit einer kurzen Aminosäuresequenz, die eine antigene Determinante für einen spezifischen Antikörper darstellt, wird als *epitope tagging* bezeichnet. Die für das Epitop kodierende Sequenz kann an die für das Protein kodierende Sequenz durch PCR-Mutagenese mit modifizierten Primern angefügt werden (s. 3.9.4.1.). Die Arbeit mit Proteinen, an die ein solches Epitop angefügt worden ist, bietet viele Vorteile: Die entsprechenden, kommerziell erhältlichen Antikörper sind spezifisch für die angefügte Aminosäuresequenz, ihre Kreuzreaktivitäten und ihr Verhalten bei der Immunpräzipitation sind bekannt.

Das HA-tag ist ein Epitop des Hämagglutinins des Influenzavirus mit der Aminosäuresequenz YPYDVPDYA. Proteine, die nach entsprechender Mutagenese dieses Epitop tragen, eignen sich für immunologische Untersuchungen mit kommerziellen Anti-HA-Antikörpern. Bei Immunpräzipitationen aus transfizierten Zellen unterscheidet der Anti-HA-Antikörper sicher zwischen dem eingesetzten HA-G γ -Protein und den endogenen G γ -Proteinen der Zelle: Alle kopräzipitierten G β -Untereinheiten müssen Dimere mit der epitopmarkierten G γ -Untereinheit gebildet haben, da – wie auch in Negativkontrollen gezeigt werden kann – über andere in der Zelle vorkommende G γ -Isoformen keine Präzipitation stattfindet.

Das His-tag besteht aus sechs Histidinresten. Proteine mit His-tag-Epitop können zum einen mit kommerziellen Anti-His-Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen werden und zum anderen über Nickelsäulen aufgereinigt werden. Zum Vorteil der Vergrößerung ihres Molekulargewichtes gegenüber nicht markierten G β -Proteinen siehe 3.11.3.3. .

3.9.4.1. PCR-Mutagenese

Als Matrize für die PCR-Mutagenese wurden 0,5 µg des jeweiligen Gγ- bzw. Gβ-Konstruktes in pcDNA31⁺, pcDNA3 oder pGEM-T Easy eingesetzt. Als *sense*-Primer wurde der entsprechende *tag*-Primer und als *antisense*-Primer entweder ein Primer aus der Sequenz des Ausgangsvektors oder aus der C-terminalen Sequenz der jeweiligen Gγ- bzw. Gβ-Isoform verwendet. Tabelle 3.4 listet die Ausgangskonstrukte und die verwendeten Primer auf.

Gγ-Isoform	Ursprungsvektor	<i>sense</i> - = <i>tag</i> -Primer	<i>antisense</i> -Primer
Gγ1	pcDNA31 ⁺	Gγ1_HA_S	GG1AS_XHO1
Gγ2	pcDNA31 ⁺	Gγ2_HA_S	pcDNA31_AS
Gγ3	pcDNA31 ⁺	Gγ3_HA_S	pcDNA31_AS
Gγ4	pcDNA31 ⁺	Gγ4_HA_S	pcDNA31_AS
Gγ5	pcDNA31 ⁺	Gγ5_HA_S	pcDNA31_AS
Gγ7	pcDNA31 ⁺	Gγ7_HA_S	pcDNA31_AS
Gγ8c	pcDNA31 ⁺	Gγ8c_HA_S	Gγ8_Eco
Gγ10	pcDNA31 ⁺	Gγ10_HA_S	Gγ1010ECO
Gγ11	pcDNA31 ⁺	Gγ11_HA_S	Gγ11_Xho
Gγ12	pcDNA31 ⁺	Gγ12_HA_S	Gγ12_Eco
Gγ13	pGEM-T Easy	1. HA_Gγ13_SE 2. HA_13_2 *	pGEM_T7
Gβ1	pcDNA3	B1HIS	Gb1_Eco
Gβ2	pcDNA31 ⁺	B2HIS	pcDNA31_AS
Gβ3	pcDNA31 ⁺	B3HIS	B3A_Eco
Gβ3s	pcDNA31 ⁺	B3HIS	B3A_Eco
Gβ3s2	pcDNA31 ⁺	B3HIS	B3A_Eco

Tabelle 3.4: Primer und Ausgangskonstrukte für die PCR-Mutagenese

* Für die Klonierung und Mutagenese wurden unterschiedliche Primer verwendet.

Die PCR wurde mit der *Pfu*-DNA-Polymerase durchgeführt, wie es unter 3.9.2.2. beschrieben wird. Durch Agarose-Gelelektrophorese wurde kontrolliert, ob das PCR-Produkt die richtige Größe aufwies. Anschließend wurde eine PCR-Aufreinigung mit dem *PCR Purification Kit* von Qiagen durchgeführt.

3.9.4.2. Restriktion von PCR-Produkt und pcDNA31⁺-Vektor

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (s. Tabelle 3.5). Dabei wurde der für die jeweilige Doppeldigestion geeignete Puffer verwendet (s. 3.4.4.3.). Die 50 µl-Ansätze wurden 70 min lang bei 37°C inkubiert. Der Expressionsvektor pcDNA31⁺ wurde mit jeweils denselben Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend mit Alkalischer Phosphatase behandelt (Inkubation bei 37°C über 1 h). Dieses Enzym spaltet terminale Phosphatgruppen von 3'- und 5'-Ende des durch die Restriktion linearisierten Vektors ab und verhindert auf diese Weise, dass sich dieser wieder zur Ringstruktur zusammenschließt.

HA-G γ -Konstrukte

Konstrukt	Klonierungsstelle
HA-G γ_1	<i>NotI</i> / <i>XhoI</i>
HA-G γ_2	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
HA-G γ_3	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i>
HA-G γ_4	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
HA-G γ_5	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
HA-G γ_7	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
HA-G γ_{8c}	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
HA-G γ_{10}	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
HA-G γ_{11}	<i>KpnI</i> / <i>XhoI</i>
HA-G γ_{12}	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
HA-G γ_{13}	<i>HindIII</i> / <i>ApaI</i>

His-G β -Konstrukte

Konstrukt	Klonierungsstelle
His-G β_1	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
His-G β_2	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
His-G β_3	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
His-G β_{3s}	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
His-G β_{3s2}	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>

Tabelle 3.5: Übersicht der Restriktionsstellen, über welche die *tag*-Konstrukte in pcDNA31⁺ kloniert wurden

Anschließend wurde eine PCR-Aufreinigung beider Restriktionen mit dem *PCR Purification Kit* von Qiagen durchgeführt und mit je 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) eluiert.

3.9.4.3. Ligation in pcDNA31⁺

Für die Ligation wurden die folgenden Komponenten zusammengegeben:

Ligationsansatz:	1	µl	Eluat der Restriktion von pcDNA31 ⁺
	1	µl	Eluat der Restriktion des PCR-Produktes
	3	µl	10x Ligase-Puffer
	1	µl	T4 DNA-Ligase (=1U) (Roche)
	24	µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde zunächst 5 h lang bei 18°C und dann 5 min lang bei 70°C inkubiert.

Die T4 DNA-Ligase verknüpft unter ATP-Verbrauch die freien Enden des PCR-Produktes mit den freien Enden des aufgeschnittenen Vektors. Das Resultat ist das jeweilige *tag*-Konstrukt im zur Ringstruktur geschlossenen Vektor pcDNA31⁺.

Bei der anschließenden Transformation in JM 109-Zellen wurden 7 µl des Ligationsproduktes eingesetzt. Mit der Klon-PCR wurden positive Klone identifiziert. Jeweils ein positiver Klon wurde angezüchtet und eine Plasmidpräparation durchgeführt.

Die so erhaltenen Vektoren wurden vom Sequenzierservice des Universitätsklinikums Essen unter Verwendung eines üblichen T7 Primers sequenziert. Die Sequenz wurde anschließend überprüft, und nur fehlerfreie Klone wurden für die weiteren Experimente verwendet.

3.9.5. Expression der hergestellten Expressionsplasmide durch transiente Transfektion von HEK-TSA

Bei der transienten Transfektion wird DNA in eine Zelle eingeschleust, ohne dass sie ins Chromosom integriert wird. Im Expressionsvektor pcDNA31 wird die Expression des jeweiligen Proteins durch einen Zytomegalievirus-Promotor (den *hCMV Immediate Early Promotor*) reguliert. Da es sich hierbei um einen starken Promotor handelt, führt die Transfektion der HEK-Zellen zu einer starken Überexpression des jeweiligen Proteins.

Am Tag vor der Transfektion wurden Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, von ihrer Unterlage abgelöst und mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY 1 (Schärfe Systems, Reutlingen) auf 55 000 Zellen pro ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Für ein Loch einer 6-Loch-Platte wurden 2 ml und für eine 6 cm-Platte 5 ml der Zellsuspension verwendet.

Am nächsten Tag war der Zellrasen zu etwa 40 – 80 % konfluent. Nachdem das Medium erneuert worden war, wurden die Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz Effectene von Qiagen, das nach dem Prinzip der Lipofektion arbeitet, transfiziert. Das Besondere an dieser Methode ist, dass die Plasmid-DNA zunächst kondensiert wird und das Lipofektionsreagenz

Effectene dann Mizellen um die kondensierte DNA bildet, die keine Größenvariation aufweisen, so dass die Bildung der Transfektionskomplexe gut reproduzierbar ist. Ummantelt von Effectene, wird das Plasmid durch die Zellmembran hindurch in das Zellinnere geschleust. Die im Folgenden genannten Puffer wurden vom Hersteller kommerziell mitgeliefert, ihre Bezeichnungen sind Namen des Herstellers.

Eingesetzte Mengen an DNA und Transfektionsreagenzien:

- für ein Loch einer 6-Loch-Platte:

0,8	µg	Plasmid-DNA (pcDNA31 ⁺)
240	µl	EC-Puffer
6,4	µl	Enhancer
20	µl	Effectene
700	µl	DMEM mit FBS und Antibiotikazusätzen

- für eine 6 cm-Platte:

2	µg	Plasmid-DNA (pcDNA31 ⁺)
280	µl	EC-Puffer
16	µl	Enhancer
50	µl	Effectene
2	ml	DMEM mit FBS und Antibiotikazusätzen

Die Plasmid-DNA wurde in EC-Puffer gelöst, der Enhancer hinzugefügt und der Ansatz bei Raumtemperatur 5 min lang inkubiert, um die DNA zu kondensieren. Anschließend wurde Effectene hinzugefügt, der Ansatz wurde gut gemischt und über weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Mizellen um die kondensierte DNA bilden konnten. Die Effectene-DNA-Komplexe wurden mit Vollmedium versetzt, und ein Ansatz wurde tropfenweise auf den Zellrasen verteilt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

3.9.5.1. Transiente Transfektion mit metabolischer Markierung

Bei dieser Methode (modifiziert nach Panchenko et al., 1998) wurden HEK-TSA-Zellen mit HA-G γ und G β transient transfiziert und 24 h nach der Transfektion in einem „Hungermedium“, welches frei von den Aminosäuren Methionin und Cystein ist, inkubiert. Darauf erfolgte die „metabolische Markierung“: Dem Hungermedium wurden [³⁵S] Methionin und [³⁵S] Cystein zugefügt, und die Zellen wurden 5 h lang in diesem Medium inkubiert. Alle in dieser Zeit synthetisierten Proteine, in deren Sequenz die beiden schwefelhaltigen Aminosäuren enthalten sind, wurden so radioaktiv markiert, also vor allem die von den HEK-

TSA-Zellen überexprimierten G-Protein-Untereinheiten HA-G γ und G β , aber auch alle endogenen Proteine d.h. auch zelleigene G β -Untereinheiten.

Am Tag vor der Transfektion wurden HEK-TSA-Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten 6cm-Platten ausgesät, so dass sie am darauffolgenden Tag 50 – 80 % konfluent waren. Die Zellen wurden dann mit den HA-G γ - und His-G β -Konstrukten in pcDNA31⁺ mit Effectene von Qiagen, wie unter 3.9.5. beschrieben, transfiziert.

24 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und der Zellrasen wurde vorsichtig mit 1 ml sterilem, 37°C warmem PBS gewaschen, um das Vollmedium möglichst vollständig zu entfernen. Darauf wurden 3 ml steriles, 37°C warmes Hungermedium, welches kein Cystein und Methionin enthielt, auf jede Platte gegeben und die HEK-TSA-Zellen im Brutschrank 2 h lang inkubiert. Danach wurde von den 3 ml Mangelmedium jeweils 1 ml entfernt und durch 1 ml vorgewärmtes, steril mit 27,7 μ l (300 μ Ci) [³⁵S] Met-Label (Hartmann Analytics, Braunschweig) vermisches Hungermedium ersetzt, welches tropfenweise auf die Kulturschale gegeben wurde. Während der darauffolgenden fünfstündigen Inkubation im Brutschrank des Radioaktivlabors wurden das im [³⁵S] Met-Label vorhandene [³⁵S] Methionin und [³⁵S] Cystein in neu synthetisierte Proteine eingebaut.

3.9.5.2. Beurteilung der Transfektionseffizienz

Zur Transfektionskontrolle wurde bei jeder Transfektionsreihe eine Zellkulturschale mit pEGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) transfiziert und die Fluoreszenz 48 h nach der Transfektion durch Fluoreszenzmikroskopie mit dem Mikroskop Axiovert S100 (Zeiss, Jena) beurteilt. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert und hat die Fähigkeit blaues Licht zu absorbieren und grünes Licht zu emittieren.

3.9.6. In vitro-Translation

Für die *in vitro*-Translation wurde das *TNT Quick Coupled Transcription / Translation System* der Firma Promega verwendet. Es besitzt den Vorteil, dass in einem System sowohl die cDNA in mRNA transkribiert wird als auch, im zweiten Schritt, die gebildete mRNA in Proteine translatiert wird. Zur Markierung der Proteine wurde [³⁵S] Methionin zugesetzt. Im Falle des Vektors pcDNA31 befindet sich 5' von der einligierten cDNA ein viraler T7

Promotor für die *in vitro*-Transkription. Die entsprechende T7 Polymerase ist in dem genannten Kit bereits enthalten.

Für ein Versuchsvolumen von 50 µl wurden die folgenden Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in ein auf Eis vorgekühltes Mikroreaktionsgefäß pipettiert, gemischt und durch kurze Zentrifugation am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt:

40	µl	Retikulozytenlysat
2	µl	[³⁵ S] Methioninlösung (0,8 MBq)
2	µl	Expressionsplasmid (pcDNA31; 0,5 µg/µl)
6	µl	H ₂ O
50	µl	

Die Ansätze wurden 90 min lang bei 30°C inkubiert. Für die Bestimmung der Translationseffizienz wurde ein Aliquot von 4 µl entnommen, mit 20 µl des 1x *Purple Red Buffer* gemischt und 2 min lang auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte die SDS-PAGE und der Nachweis der im Gel enthaltenen Radioaktivität mit Hilfe eines *PhosphoImaging Systems*.

3.10. Westernblot-Untersuchungen

3.10.1. Herstellung von Ganzzelllysaten für den Westernblot

Je zwei Löcher einer 6-Loch-Platte wurden mit dem gleichen Konstrukt transfiziert, wie unter 3.9.5. beschrieben. 48 h nach der Transfektion wurden die Ganzzelllysate hergestellt, indem das Medium abgesaugt wurde und die Zellen mit 300 µl eiskaltem Waschpuffer abgespült wurden. Ganzzelllysate mit dem gleichen Konstrukt wurden zusammengeführt. Ein Aliquot von 60 µl wurde für die Proteinbestimmung entnommen, der Rest der Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.10.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Ganzzelllysate wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* der Firma Pierce (Rockford, USA), welches nach der Bicinchoninsäure-Methode (Smith et al., 1985) arbeitet, nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Diese Methode verbindet die Biuret-Reaktion, also die im alkalischen Medium stattfindende Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Peptidbindungen, mit der kolorimetrischen Detektion des Cu¹⁺ durch die Bicinchoninsäure. Durch Chelatbildung von zwei Molekülen Bicinchoninsäure mit einem

einfach positiv geladenen Kupferion entsteht ein violett gefärbter Komplex, dessen Absorption bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ sich im Bereich von 20 - 2000 $\mu\text{g/ml}$ linear zu steigenden Proteinkonzentrationen verhält. Als Proteinstandard zur Erstellung einer Eichkurve diente eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin in Konzentrationen von 25 - 1500 $\mu\text{g/ml}$. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Graph Pad Prism* (Graph Pad Software, San Diego, USA) durch lineare Regressionsanalyse.

3.10.3. Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Die Lysate wurden mit dreifach konzentriertem Probenpuffer nach Laemmli (im Falle der His-G β -Proben) auf eine Proteinkonzentration von 1 - 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Für die HA-G γ -Proben wurde dieser Puffer nach Christy modifiziert (Neer, 1992), da das im Laemmli-Puffer verwendete Bromphenolblau eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit in der SDS-PAGE aufweist als die 6 bis 8 kDa großen G γ -Proteine. Stattdessen wurde dem Probenpuffer der Farbstoff m-Cresol zugesetzt, der bei der Elektrophorese schneller läuft als die G γ -Proteine, so dass diese sich mit Sicherheit noch auf dem Gel befinden, wenn die Farbstofffront das Gelende erreicht hat.

Die Proben wurden 5 min lang auf 95°C erhitzt. Hierbei werden die Proteine in Anwesenheit von SDS denaturiert, außerdem werden durch das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken gespalten.

3.10.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrotransfer

Durch die SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen im elektrischen Feld nach ihrer molaren Masse aufgetrennt.

In einem Standardapparat für die Vertikalelektrophorese der Firma Hoefer wurde zunächst ein 1 cm hohes Verschlussgel gegossen, welches nach 15 min ausgehärtet war und vom Trenngel überschichtet wurde. Bei diesem handelte es sich im Falle der His-G β -Proben um ein 8- bis 20-prozentiges Gradientengel, dessen Prozentigkeit von oben nach unten stetig zunahm. Das Trenngel wurde unter Verwendung einer üblichen Gradientenmischkammer, die die 8-prozentige Gelmischung mit der 20-prozentigen kontinuierlich mischt, zwischen die Glasscheiben der Vertikalgelapparatur eingefüllt. Zur Auftrennung der HA-G γ -Proben wurde ein 15-prozentiges Trenngel gegossen.

Die Polymerisation nahm etwa 60 min bei Raumtemperatur in Anspruch. Anschließend wurde das Trenngel von einem Sammelgel überschichtet und ein Probenkamm wurde eingesetzt.

Nach dem Aushärten des Gels wurde der Kamm entfernt und die Proben konnten in die Taschen aufgetragen werden.

Beim Ansetzen von Trenn- und Sammelgel wurden zunächst die Acrylamidlösung, H₂O, Trenn- bzw. Sammelgelpuffer und SDS 10% gemischt. Unmittelbar vor dem Gießen wurde die Polymerisation durch Zugabe von APS 10% und TEMED gestartet.

Pro Tasche wurden 100 µg Protein aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker diente der *Kaleidoscope Prestained Marker* der Firma Bio-Rad.

Die Gele wurden in eine Gelkammer platziert, deren unterer Tank im Falle der His-Gβ-Gele mit Laufpuffer und im Falle der HA-Gγ-Gele mit Anodenpuffer gefüllt war. Der obere Tank wurde für beide Geltypen mit Laufpuffer aufgefüllt.

Die Auftrennung erfolgte zunächst über Nacht bei 50 V und wurde am nächsten Morgen bei 300 V unter Kühlung fortgeführt, bis die Farbstofffront das Gel vollständig durchlaufen hatte.

Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran als Nass-Elektrotransfer nach Towbin. Hierbei wurde für die His-Gβ-Proteine eine Nitrozellulose mit 0,45 µm Porengröße und für die HA-Gγ-Proteine eine verstärkte Nitrozellulose mit 0,22 µm Porengröße eingesetzt, die diese kleinen Proteine stärker bindet. Die Transfermembran wurde zunächst in H₂O getaucht und darauf einige Minuten lang in Transferpuffer gelegt. Sie wurde dann luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Gel und Nitrozellulose wurden, auf beiden Seiten von zwei in Transferpuffer getränkten Whatman 3MM Filterpapieren umgeben, in einer Sandwich-Transfer-Apparatur befestigt und in die Blotkammer gesetzt, die ebenfalls mit Transferpuffer gefüllt war. In dieser erfolgte der Elektrotransfer bei 0,7 A über eine Zeit von 2 h. Zur Transferkontrolle wurde die Membran 10 min lang in Ponceau S Lösung, welche die Proteinbanden auf der Nitrozellulose sichtbar macht, gefärbt. Anschließend wurde der rote Farbstoff von dem Filter durch zehnminütiges Waschen in PBS wieder vollständig entfernt. Der Blot wurde zwischen zwei Whatman Papieren bei -20°C aufbewahrt.

3.10.5. Immunologischer Nachweis der durch HA-tag und His-tag markierten Proteine im Westernblot

Alle Inkubationen der nachfolgend beschriebenen Immunoblots wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.10.5.1. Immunologischer Nachweis von Hexahis-markierten Proteinen mit einem Tetra-His-Antikörper

Für den immunologischen Nachweis von His-G β -Proteinen wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper der Firma Qiagen verwendet, der ein Tetra-His-Motiv in Proteinen erkennt. Zunächst wurde der Blot angefeuchtet durch 2 x 10-minütiges Waschen in TBS, anschließend wurde er 1 h lang in Blocklösung inkubiert. Er wurde dann 2 x 10 min in TBS Tween/Triton und 1 x 10 min in TBS gewaschen, bevor er 1 h lang mit dem Tetra-His-Antikörper, der in Antikörperverdünnungslösung auf eine Konzentration von 0,2 μ g/ml eingestellt war, inkubiert wurde. Wiederum wurde 2 x 10 min mit TBS Tween/Triton und 1 x 10 min mit TBS gewaschen, um den Filter darauf 1 h lang mit dem Peroxidase-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper, der in Zweitantikörper-Verdünnungslösung auf eine Konzentration von 0,04 μ g/ml eingestellt war, zu inkubieren. Zum Schluss wurde 3 x 10 min in TBS Tween/Triton und 1 x 10 min in TBS gewaschen. Der Blot wurde darauf mit einer Lösung überschichtet, die zu gleichen Teilen aus *Enhanced Luminol* und *Oxidizing Reagent* von der Firma NEN (Boston, USA) bestand und die das Substrat für die Peroxidase darstellte. Nach einer Einwirkzeit von 1 min ließ man die Lösung ablaufen und der Blot wurde 2 min lang gegen einen Kodak X-AR Film exponiert.

3.10.5.2. Immunologischer Nachweis HA-tag-markierter Proteine

Bei dem für diesen Immunoblot verwendeten Antikörper handelt es sich um ein polyklonales Kaninchenserum, welches die Aminosäuresequenz des HA-Epitops (YPYDVPDYA) erkennt. Der Antikörper wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnologies bezogen.

Die Membran wurde 30 min lang in Blotto A geblockt und darauf mit dem primären Antikörper, der in Blotto A auf eine Konzentration von 0,5 μ g/ml eingestellt war, 1 h lang inkubiert. Nach drei fünfminütigen Inkubationsschritten in Waschlösung A folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper, der in Blotto A eine Konzentration von 0,04 μ g/ml besaß. Zum Entfernen nicht gebundenen Zweitantikörpers wurde 3 x 5 min lang in Waschlösung A und 1 x 5 min lang in TBS gewaschen, bevor die

Luminol-Reaktion durchgeführt wurde. Die Expositionszeiten gegen den Film betrugen, je nachdem, wie gut sich das jeweilige HA-G γ_1 mit dieser Methode darstellen ließ, 1 - 45 min.

3.10.5.3. Immunologischer Nachweis von (HA-)G γ_1 mit einem G γ_1 -Antikörper

Es wurde, exemplarisch für alle (HA-)G γ -Proteine, ein Immunoblot von G γ_1 mit und ohne HA-tag mit einem G γ_1 -Antikörper von der Firma Santa Cruz Biotechnologies durchgeführt, bei dem es sich um ein polyklonales Kaninchenserum handelt, welches ein N-terminales Epitop des bovinen G γ_1 erkennt. Mit diesem Antikörper kann auch das humane G γ_1 nachgewiesen werden, dessen Aminosäuresequenz zu 99% identisch mit der bovinen G γ_1 -Sequenz ist. Das Protokoll des Versuches ist identisch mit dem für den Anti-HA-Westernblot (s. 3.10.5.2.).

3.11. Ko-Immunpräzipitation

3.11.1. Prinzip der Immunpräzipitation

Im ersten Schritt der Immunpräzipitation erkennt ein Antikörper spezifisch ein Epitop eines Antigenproteins und bildet mit ihm den Antigen-Antikörper-Komplex (=AG-AK-Komplex). Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung dieses AG-AK-Komplexes an Protein A-Agarose. Protein A ist ein ca. 42 kDa großes Oberflächenprotein des *Staphylococcus aureus*, das IgG-Moleküle am Fc-Fragment bindet. Koppelt man Protein A an das Polysaccharid Agarose, so ist die entstandene Protein A-Agarose in der Lage viele AG-AK-Komplexe zu binden. Der resultierende AG-AK-Protein A-Agarose-Komplex kann durch Zentrifugation pelletiert und durch mehrfache Wasch- und Zentrifugierschritte von nicht gebundenen Proteinen, die sich in der Ausgangslösung befanden, gereinigt werden.

Von Ko-Immunpräzipitation spricht man, wenn an das Antigenprotein ein zweites Protein gebunden ist, welches selbst nicht vom Antikörper erkannt wird, aber über die Bindung an das vom Antikörper erkannte Antigenprotein mit in den AG-AK-Protein A-Agarose-Komplex aufgenommen wird. Je stärker nun die Bindung des zweiten Proteins an seinen Partner ist, desto mehr wird sich am Ende der Waschschrte von ihm im Pellet finden lassen.

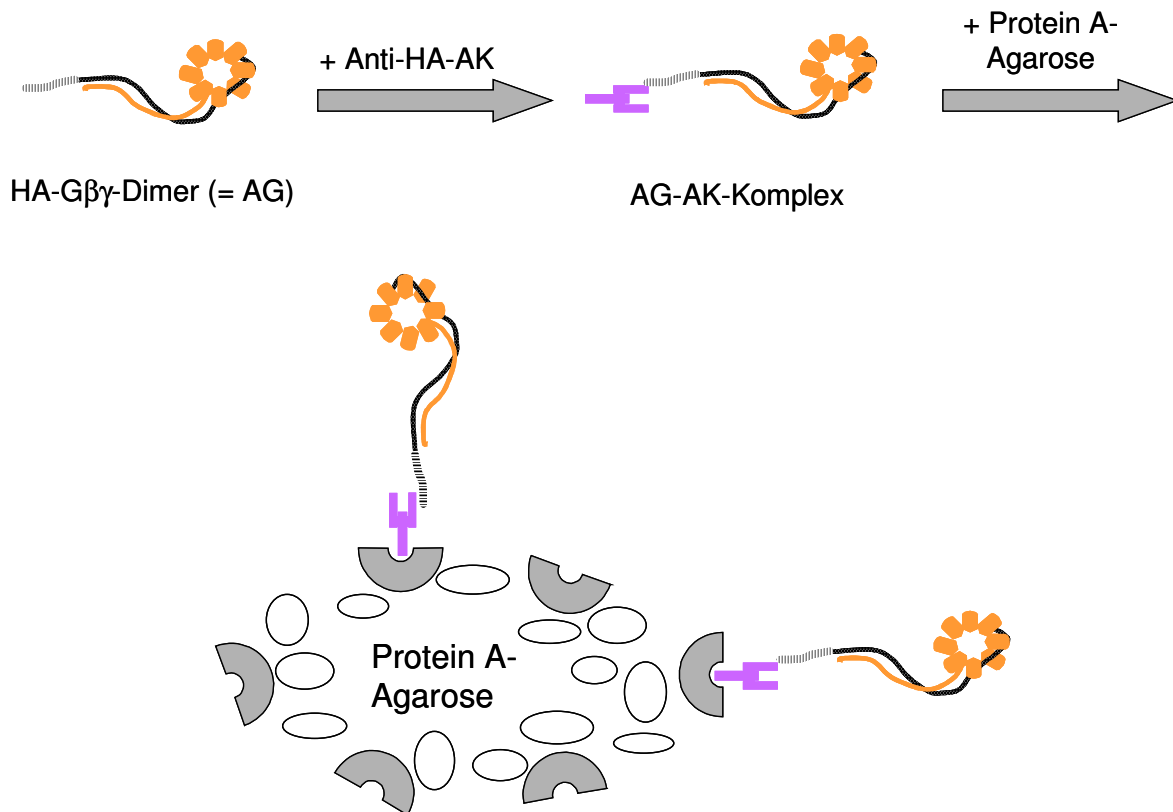


Abb. 3.2: Schema der Ko-Immunpräzipitation von HA-Gβγ-Dimeren mit einem Anti-HA-Antikörper

Im ersten Schritt hat sich aus einer Gβ- und einer HA-Gγ-Untereinheit ein HA-Gβγ-Dimer gebildet, welches im folgenden „Antigen“ (AG) genannt wird (die Gβ-Untereinheit ist in orange, die Gγ-Untereinheit in schwarz und das HA-tag schraffiert dargestellt).

Im zweiten Schritt bindet der Anti-HA-Antikörper an seine antigene Determinante, das HA-Epitop, wodurch der Antigen-Antikörper-Komplex (AG-AK-Komplex) gebildet wird.

Im dritten Schritt wird schließlich der „AG-AK-Protein A-Agarose-Komplex“ gebildet: Protein A (dargestellt als graue Schalen) kann den AG-AK-Komplex über den Fc-Teil des Antikörpers binden. Protein A-Agarose, welche einen Komplex aus Agarose und vielen Protein A-Einheiten darstellt, ist daher in der Lage, viele AG-AK-Komplexe zu binden. Durch Zentrifugation kann der entstandene AG-AK-Protein A-Agarose-Komplex präzipitiert und durch wiederholte Waschschritte von anderen in der Lösung befindlichen Proteinen (z.B. von freien Gβ-Untereinheiten) gereinigt werden.

Das Prinzip der weiteren Versuche war, dass mit einem Anti-HA-Antikörper HA-Gγ-Proteine präzipitiert wurden. Hatten sich Dimere aus diesen epitopmarkierten Gγ-Proteinen und Gβ-Proteinen gebildet, so wurden auch diese Gβ-Proteine ko-präzipitiert (s. auch die Schemazeichnung hierzu in Abb. 3.2).

Hierbei wurden einmal HA-Gγ- und Gβ-Proteine durch *in vitro*-Translation hergestellt, in einer weiteren Versuchsreihe wurden die entsprechenden Dimere durch Ko-Expression in HEK-TSA-Zellen *in vivo* generiert.

3.11.2. Ko-Immunpräzipitation *in vitro* translaterter HA-G γ -G β -Dimere

3.11.2.1. *In vitro*-Translation

Zunächst wurden die G β -Isoformen G β_1 , G β_2 , G β_3 , G β_{3s} , G β_{3s2} und G β_4 in getrennten Ansätzen durch *in vitro*-Translation, wie unter 3.9.6. beschrieben, hergestellt. Außerdem konnten auch so die entsprechenden epitopmarkierten G γ -Proteine bzw. als Negativkontrollen die entsprechenden G γ -Proteine ohne HA-Markierung synthetisiert werden.

3.11.2.2. Dimerisierung

Die Arbeitsgruppe von Eva Neer hatte gezeigt, dass G β - und G γ -Untereinheiten, die durch getrennte *in vitro*-Translation generiert wurden, in der Lage sind nach Mischen miteinander Dimere zu bilden (Schmidt und Neer, 1991).

Für die Dimerisierung wurde in sieben Mikroreaktionsgefäße jeweils das gleiche Volumen an HA-G γ -Translationsmischung gegeben (15 - 32 μ l, je nach Translationseffizienz) und in ein achttes 15 - 20 μ l G γ -Translationsmischung. Zu (1) - (6) wurde jeweils 20 μ l G β -Translationsmischung hinzugefügt, so dass eine Reihe folgendermaßen aussah:

- (1) HA-G γ_x + G β_1
- (2) HA-G γ_x + G β_2
- (3) HA-G γ_x + G β_3
- (4) HA-G γ_x + G β_{3s}
- (5) HA-G γ_x + G β_{3s2}
- (6) HA-G γ_x + G β_4
- (7) HA-G γ_x allein
- (8) G γ_x allein

Es wurden elf Immunpräzipitationsreihen durchgeführt mit (HA-)G γ_x = G γ_1 , G γ_2 , G γ_3 , G γ_4 , G γ_5 , G γ_7 , G γ_{8c} , G γ_{10} , G γ_{11} , G γ_{12} und G γ_{13} . Die Mengenverhältnisse wurden hierbei so gewählt, dass bei jeder Reihe das jeweilige HA-G γ , verglichen mit den G β -Proteinen, im Überschuss vorlag.

Die Ansätze (1) bis (6) wurden nun 90 min lang bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert, so dass sich Dimere aus HA-G γ und G β bilden konnten. Währenddessen wurden die Ansätze (7) und (8) auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Dimerisierungsreaktion durch Zugabe von 500 μ l eiskaltem RIPA-Puffer zu (1) - (8) gestoppt.

3.11.2.3. Ko-Immunpräzipitation

Alle weiteren Schritte fanden bei 4°C statt und jede Inkubation im Überkopfschüttler wurde bei niedrigstmöglicher Stufe durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde ein sogenanntes *pre-clearing* durchgeführt. Hierbei werden Proteine, die unspezifisch (d.h. ohne Vermittlung eines Antikörpers) an die Protein A-Agarose binden, entfernt.

Hierzu wurden zu jedem der unter 3.11.2.2. beschriebenen Ansätze 20 µl Protein A-Agarose-Suspension (Santa Cruz Biotechnologies) pipettiert. Anschließend wurde 15 sec bei voller Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert um die Agarose zu pellettieren. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Pellets verworfen. Zu jedem Ansatz wurden nun 10 µl (4 µg) monoklonaler Anti-HA-Antikörper (Klon 12CA5; Roche, Mannheim) hinzugefügt, der spezifisch an das HA-Epitop des HA-Gγ bindet. Es folgte eine 90-minütige Inkubation im Überkopfschüttler. Im zweiten Schritt wurden je 40 µl Protein A-Agarose-Suspension hinzugefügt und die Ansätze wurden nochmals 60 min lang im Überkopfschüttler inkubiert.

Es schlossen sich die folgenden Waschschrte an: Die Agarose wurde durch Zentrifugation (15 sec; 10.000 rpm) pelletiert, der Überstand wurde vorsichtig entnommen und verworfen. Die Pellets wurden anschließend in 500 µl eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert.

Diese Waschschrte wurden insgesamt viermal wiederholt.

Abschließend wurden die Pellets jeweils in 400 µl 0,05 M Tris-Cl, pH 7,5 resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 70 µl 1 x *Purple Red Buffer* aufgenommen und 5 min lang bei 95°C erhitzt.

3.11.2.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proben (inklusive der Kontrollen der Translationseffizienz) wurden dann auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über Nacht bei 50 V, wurde am nächsten Morgen bei 300 V fortgeführt und, kurz bevor die Farbstofffront das Trenngel erreichte, beendet. Die Gele wurden von den Glasplatten gelöst und, nachdem die Laufront abgetrennt worden war, auf angefeuchtetes Whatman-Filterpapier gelegt und mit angefeuchteter Einmachfolie bedeckt. Darauf wurden die Gele 2 h lang unter Vakuum auf einem Geltrockner (Bio-Rad, München) getrocknet.

3.11.2.5. Autoradiographie und quantitative Auswertung durch Densitometrie

Die eingebaute Radioaktivität wurde durch Exposition der Gele gegen einen *Storage Phosphor Screen* und anschließende Auswertung mit einem *Storm 860 PhosphoImager* (Molecular Dynamics, Krefeld) nachgewiesen. Die Expositionszeiten variierten von 24 h (Kontrolle der Translationseffizienz) bis zu sechs Tagen.

Die weitere quantitative Analyse der Banden erfolgte mit Hilfe der Densitometrie Software Image Quant 5.0 (Molecular Dynamics).

3.11.3. Immunpräzipitation von HA-G γ -G β -Dimeren nach Transfektion von HEK-TSA und metabolischer Markierung

3.11.3.1. Transfektion und metabolische Markierung

HEK-TSA-Zellen auf 6 cm-Platten (beschichtet mit Poly-L-Lysin) wurden mit Kombinationen von HA-G γ - und His-G β -Isoformen kotransfiziert und 24 h nach der Transfektion mit [35 S] Methionin und [35 S] Cystein metabolisch markiert, wie unter 3.8.5.1. beschrieben.

Eine Reihe bestand aus folgenden Ansätzen:

- (1) HA-G γ_x allein
- (2) HA-G γ_x + His-G β_1
- (3) HA-G γ_x + His-G β_3
- (4) HA-G γ_x + His-G β_{3s}
- (5) HA-G γ_x + His-G β_{3s2}

Es wurden Versuchsreihen mit HA-G γ_{12} , HA-G γ_5 und HA-G γ_{8c} durchgeführt.

3.11.3.2. Lyse der Zellen

Nachdem die Zellen metabolisch markiert worden waren, wurde das Markierungsmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen, um die Zellen von nicht eingebauten radioaktiven Aminosäuren zu befreien. Auf jede Platte wurde nun 1 ml eiskalter Lysepuffer gegeben. Die Schalen wurden mit Parafilm umwickelt, in eine mit Eis gefüllte Plastikschaale gesetzt und 30 min lang auf dem ELISA-Schüttler bei niedriger Stufe hin und her bewegt, so dass der Zellrasen an allen Stellen vom Puffer überspült wurde. Hierbei wurden die Zellen lysiert, indem das im Lysepuffer vorhandene Detergenz Triton X-100 ihre Zellmembranen auflöste.

3.11.3.3. Ko-Präzipitation der synthetisierten HA-G γ -G β -Dimere

Nach der Zelllyse wurden die von den HEK-TSA-Zellen synthetisierten, [^{35}S] markierten HA-G γ -G β -Dimere mit einem HA-Antikörper präzipitiert. Es ergab sich nun das Problem, dass die endogenen G β -Proteine der Zelle ebenfalls über das HA-tag kopräzipitiert werden, so dass sich in der SDS-PAGE die Bande der endogenen G β -Proteine mit der Bande des G β_1 - oder G β_3 -Untereinheit, mit denen die Zellen transfiziert wurden, überlagert. Dieses Problem wurde so gelöst, dass für die Transfektion G β -Untereinheiten mit N-terminalem His-Epitop verwendet wurden. Durch die Verlängerung des Proteins um sechs Histidinreste verlangsamt sich dessen Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese, so dass seine Bande ein Stück oberhalb der Bande der endogenen G β -Proteine zu liegen kommt. Es ist bekannt, dass sowohl das His-tag der G β -Untereinheit als auch das HA-tag der G γ -Untereinheit die Dimerbildung zu G $\beta\gamma$ und die Trimerbildung mit der G α -Untereinheit zum funktionell aktiven G-Protein nicht beeinträchtigen (Garcia-Higuera et al., 1998; Mende et al., 1995). Da die kurzen G β -Isoformen G β_{3s} und G β_{3s2} durch ihre höhere Wandergeschwindigkeit bei der SDS-PAGE unterhalb der endogenen G β -Bande zu finden sind, ist bei ihnen das His-tagging nicht nötig. Dennoch haben wir nach einem Probeversuch His-G β_{3s} und His-G β_{3s2} für die Transfektion verwendet um vergleichbare Bedingungen zu erhalten.

Alle weiteren Schritte fanden bei 4°C statt, und jede Inkubation im Überkopfschüttler wurde bei niedrigstmöglicher Stufe durchgeführt.

Die Lysate wurden in Mikroreaktionsgefäße überführt und ihnen wurde je 40 μl Protein A-Agarose-Suspension zugefügt. Die darauffolgende Inkubation im Überkopfschüttler über eine Zeit von 45 min diente dem *pre-clearing*. Die Agarose und nicht lysierte Zellbestandteile wurden durch zehnminütige Zenrifugation bei 13.000 rpm in der Mikrozentrifuge pelletiert. Die Überstände wurden in neue Mikroreaktionsgefäße überführt. Nachdem den vorgereinigten Lysaten je 15 μl Anti-HA-Antikörper zugegeben worden waren, wurden sie über Nacht im Überkopfschüttler inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden zu jedem Ansatz 80 μl Protein A-Agarose hinzugefügt. Es folgte eine zweistündige Inkubation im Überkopfschüttler, der sich die folgenden Waschschrte anschlossen:

Nach Zentrifugation (15 sec; 13.000 rpm) wurden die Agarose-Pellets vorsichtig von den Überständen befreit, in je 1 ml eiskaltem Lysepuffer mit NaCl resuspendiert und 15 min lang im Überkopfschüttler gewaschen.

Dieser Waschschrte wurde dreimal wiederholt.

Abschließend wurden die Pellets in 60 µl 1x *Purple Red Buffer* aufgenommen, 10 min lang auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Das weitere Vorgehen (SDS-PAGE, Trocknen des Gels, Autoradiographie und Densitometrie) unterschied sich nicht von dem bei der Immunpräzipitation *in vitro* translaterter HA-G γ -G β -Dimere (s. 3.11.2.4. und 3.11.2.5.).

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung und Mutagenese von Plasmiden für die Expression von G β - und G γ -Untereinheiten

In der vorliegenden Arbeit sollte die Dimerisierung von G β -Proteinen mit den verschiedenen G γ -Untereinheiten mit Hilfe der Immunpräzipitation untersucht werden. Für diese Versuche wurden zunächst HA- bzw. His-*tag*-Konstrukte der entsprechenden G-Protein-Untereinheiten hergestellt und anschließend die Expression der von ihnen kodierten Proteine überprüft.

4.1.1. PCR-Mutagenese

Als Matrize für die Herstellung der verschiedenen mit einem *epitope tag* versehenen Vektorkonstrukte dienten Plasmidvektoren, die für die Wildtypproteine kodierten (s. Tabelle 3.1). Die entsprechende *epitope tag*-Sequenz wurde durch eine PCR-Mutagenese unter Verwendung entsprechender, speziell hierfür entworfener *sense*-Primer (s. Tabellen 3.2 und 3.3) hergestellt. PCR-Produkte, welche die erwartete Größe aufwiesen, wurden anschließend aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und in den Expressionsvektor pcDNA31⁺ ligiert. Es schloss sich die Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen an. Durch „Klon-PCR“ identifizierte positive Klone wurden angezüchtet. Anschließend wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die auf diese Weise hergestellten Expressionsplasmide wurden sequenziert und die Sequenz wurde auf ihre Richtigkeit überprüft. (Eine Übersicht über alle bei den folgenden Versuchen verwendeten Konstrukte gibt die Tabelle 3.1 in Kapitel 3.)

4.1.2. Expressionskontrolle der „*epitope tag*-Konstrukte“ durch transiente Transfektion

Zur Expressionskontrolle der hergestellten Konstrukte wurden HEK 293- bzw. HEK-TSA-Zellen transient mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 48 h wurden Ganzzelllysate hergestellt (s. 3.10.1.) und deren Proteinkonzentration wurde ermittelt. Die Proben wurden durch Erhitzen in Probenpuffer denaturiert (s. 3.10.3.). Darauf erfolgte die elektrophoretische Auftrennung. Als Negativkontrollen wurden identisch behandelte Proben von nicht transfizierten HEK 293- bzw. HEK-TSA-Zellen aufgetragen. Nach Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde der immunologische Nachweis der His-G β - bzw. HA-G γ -Proteine mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt.

4.1.2.1. Immunologischer Nachweis der Expression der His-G β -Konstrukte

Die Expression der His-G β -Konstrukte wurde durch einen Immunoblot mit einem Tetra-His-Antikörper, der spezifisch an eine Sequenz von vier aufeinander folgenden Histidinresten bindet, nachgewiesen (s. Abb. 4.1).

Die G β -Untereinheiten G β_1 , G β_2 , und G β_3 weisen eine Größe von ca. 35 – 37 kDa auf. Durch Größenvergleich mit einem Molekulargewichtsmarker können auf den Bahnen 2, 3 und 4 kräftige Banden im Bereich von 37 - 38 kDa identifiziert werden, welche jeweils His-G β_1 , His-G β_2 bzw. His-G β_3 entsprechen. Die Banden der kleineren Proteine His-G β_{3s} und His-G β_{3s2} findet man auf den Bahnen 5 und 6 bei einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa. Bei den Negativkontrollen auf den Spuren 1 und 7 dagegen sind im Bereich von 34 – 38 kDa keine entsprechenden Banden zu sehen. Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass die beschriebenen Banden auf den Bahnen 2 bis 6 durch eine unspezifische Bindung des Tetra-His-Antikörpers an endogene Proteine der HEK 293-Zellen hervorgerufen werden.

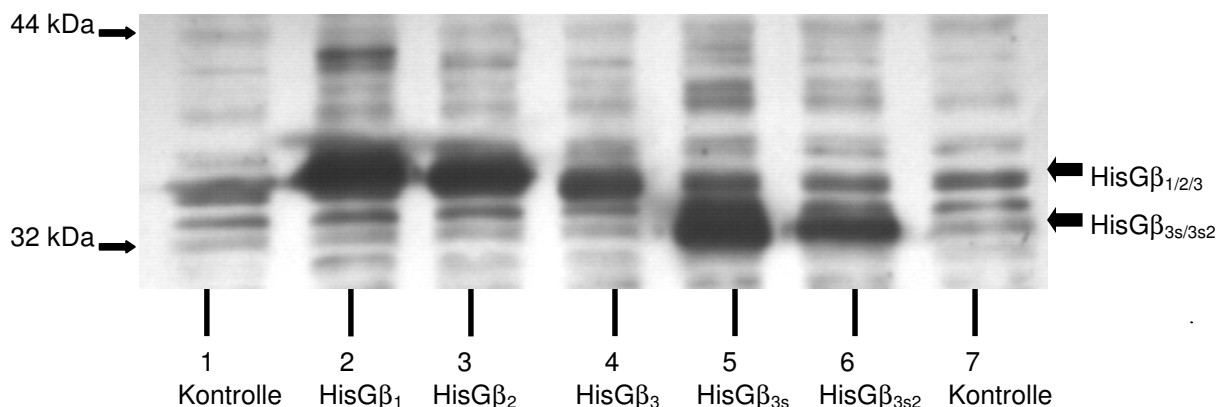


Abb. 4.1: Immunologischer Nachweis der Expression der His-G β -Konstrukte nach transienter Transfektion in HEK 293-Zellen mit einem Tetra-His-Antikörper. Die Lage der Markerproteine mit den Molekulargewichten von 32 bzw. 44 kDa ist auf der linken Seite der Abbildung angegeben.

4.1.2.2. Immunologischer Nachweis der Expression der HA-G γ -Konstrukte

Um die HA-G γ -Konstrukte im Westernblot mit einem Anti-HA-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies) nachzuweisen, genügte im Falle von HA-G γ_2 , HA-G γ_3 und HA-G γ_4 (Abb. 4.3a) sowie HA-G γ_7 , HA-G γ_{8c} und HA-G γ_{12} (Abb. 4.3b) eine Belichtungszeit von 1 min. Die G γ -Isoformen HA-G γ_1 , HA-G γ_5 und HA-G γ_{11} benötigten hierfür längere Belichtungszeiten von bis zu 45 min (Abb. 4.3c).

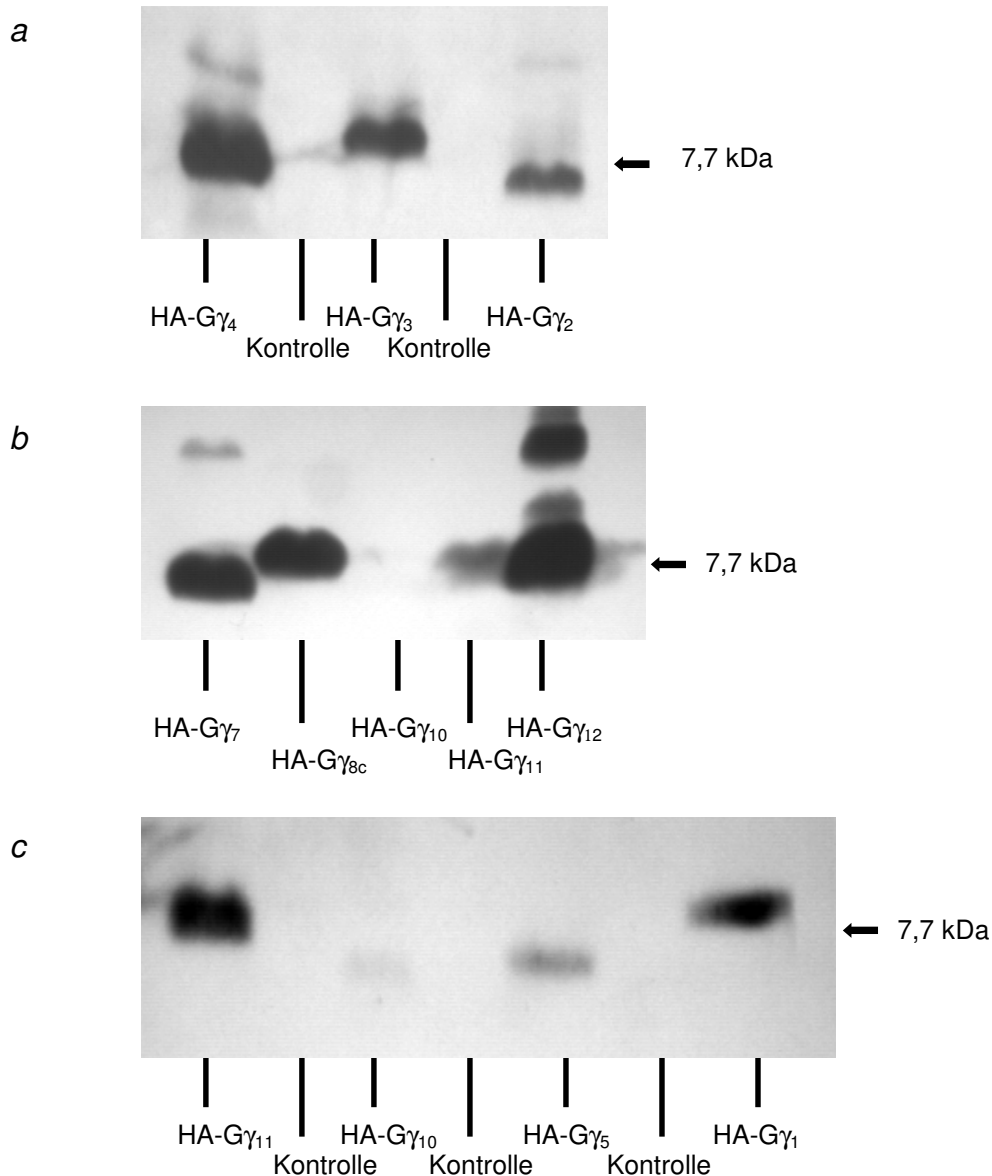


Abb. 4.3: Immunologischer Nachweis der Expression der HA-G γ -Konstrukte HA-G γ_2 , HA-G γ_3 und HA-G γ_4 (a), HA-G γ_7 , HA-G γ_{8c} und HA-G γ_{12} (b) sowie HA-G γ_1 , HA-G γ_5 , HA-G γ_{10} und HA-G γ_{11} (c) mit einem Anti-HA-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies). Die Position des Molekulargewichtsmarkers von 7,7 kDa Größe ist jeweils durch einen Pfeil markiert. Die Unterschiede in den Molekulargewichten der verschiedenen HA-G γ -Untereinheiten sind gut erkennbar.

Im Falle von HA-G γ_{10} fanden wir unter diesen Bedingungen nur eine sehr schwache Bande. Unter der Vorstellung, dass die Koexpression mit einer G β -Untereinheit das G γ -Protein möglicherweise stabilisieren könnte, wurde HA-G γ_{10} zusammen mit His-G β_1 überexprimiert. Unter diesen Bedingungen ließ sich nun deutlich erkennbar eine Proteinbande in Höhe der erwarteten Größe von HA-G γ_{10} nachweisen (Abb. 4.4a). Ähnliche Beobachtungen konnten

auch bei weiteren Kotransfektionen mit anderen $G\gamma$ - $G\beta$ -Kombinationen gemacht werden (nicht gezeigt).

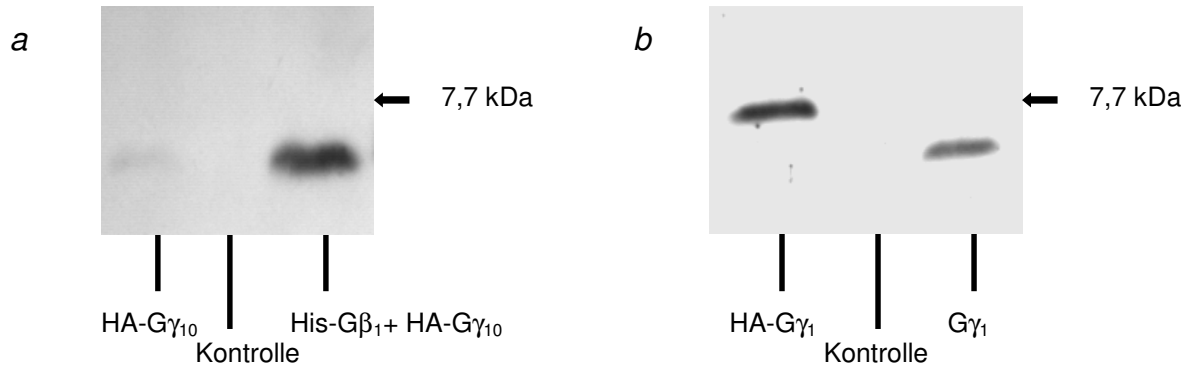


Abb. 4.4: *a)* Durch Kotransfektion zusammen mit His-G β_1 wird die Expression von HA-G γ_{10} deutlich verstärkt. Nachweis mit einem Anti-HA-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies). *b)* Nachweis von HA-G γ_1 und G γ_1 mit einem G γ_1 -Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies). Das durch das HA-Epitop bedingte höhere Molekulargewicht von HA-G γ_1 im Vergleich zu G γ_1 ist gut zu erkennen.

Wie zu erwarten, lagen die relativen Molekulargewichte der epitopmarkierten $G\gamma$ -Proteine mit 7 – 9 kDa etwas über denen der Wildtypproteine, die einen Bereich von 6 - 8 kDa umfassen.

Außerdem wurde komplementär am Beispiel von (HA-)G γ_1 der immunologische Nachweis mit einem Antikörper durchgeführt, der nicht das HA-Epitop, sondern spezifisch eine Sequenz am N-Terminus von G γ_1 erkennt. (Abb. 4.4*b*). Sehr schön sieht man den kleinen Unterschied im Molekulargewicht, der durch das HA-Epitop bedingt ist.

Zusammengefasst bestätigen diese Experimente, dass die hergestellten Konstrukte für Proteine mit den erwarteten Größen und Eigenschaften kodieren.

4.2. Klonierung von G γ_{13} und Epitopmarkierung

Die Sequenz der $G\gamma$ -Isoform G γ_{13} wurde 1999, also im Laufe dieser Promotionsarbeit, veröffentlicht. Diese Isoform wird in verschiedenen Hirnregionen, im Riechepithel und in der Retina exprimiert (Huang et al., 1999). Des Weiteren wurde berichtet, dass alle Geschmackssinneszellen, die G γ_{13} exprimieren, auch G β_3 -Transkripte besitzen, was diese Isoform für unsere Analysen besonders interessant machte. Weil uns der entsprechende Klon bedauerlicherweise nicht zur Verfügung gestellt wurde, haben wir, um auch mit dieser $G\gamma$ -Untereinheit Versuche durchführen zu können, G γ_{13} nachkloniert.

4.2.1. Klonierung von $G\gamma_{13}$

Den ersten Schritt für die Klonierung von $G\gamma_{13}$ stellte die RNA-Präparation dar, wobei menschliches Hirn und Retinoblastomzellen – zwei Gewebe, in denen $G\gamma_{13}$ exprimiert wird – als Ausgangsgewebe dienten (s. 3.9.3.1.). Mit der so präparierten RNA wurde eine Reverse Transkriptase-Reaktion durchgeführt (s. 3.9.3.2.). Die hierdurch erhaltene cDNA diente anschließend als Matrize für eine PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase und den Primern hG γ 13_SE und hG γ 13_AS.

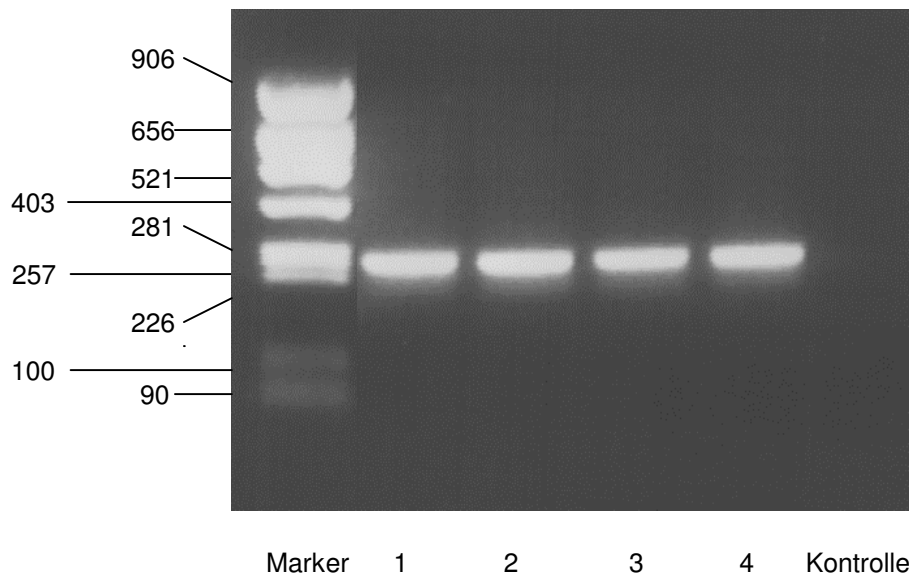


Abb. 4.5: PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase und den Primern hG γ 13_SE und hG γ 13_AS

Als Matrize diente jeweils die durch Reverse Transkriptase-Reaktion gewonnene cDNA aus menschlichem Hirn (Spuren 1 und 2) bzw. aus Retinoblastomzellen (Spuren 3 und 4). Die Größen der einzelnen Banden des pBR322 DNA/*Alu*I-Markers sind am linken Bildrand in Basenpaaren angegeben.

Abbildung 4.5 zeigt das Ergebnis dieser PCR: Die PCR-Produkte, bei denen cDNA aus menschlichem Hirn (Spuren 1 und 2) bzw. aus Retinoblastomzellen (Spuren 3 und 4) als Matrize diente, liegen alle in der erwarteten Größenordnung von ca. 220 Basenpaaren (bp).

Als Nächstes wurden die PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T Easy ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation des Ligationsproduktes in kompetente *E. coli*. Ein Klon, welcher in der darauffolgenden Klon-PCR ein *Insert* der erwarteten Größe aufwies, wurde angezüchtet und eine Plasmidpräparation aus dem gewonnenen Material durchgeführt (s. 3.9.3.4.). Die Sequenzierung ergab eine korrekte Sequenz von $G\gamma_{13}$ in pGEM-T Easy.

4.2.2. Epitope Tagging und Umklonierung von $G\gamma_{13}$

Für die Klonierung von $G\gamma_{13}$ in den Expressionsvektor pcDNA31⁺ wurde $G\gamma_{13}$ in pGEM-T Easy zunächst mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* behandelt. Darauf wurde das Reaktionsprodukt in einem Agarosegel aufgetrennt und eine Gelextraktion durchgeführt. Das Produkt der Gelaufreinigung wurde in den mit *EcoRI* und mit Alkalischer Phosphatase behandelten pcDNA31⁺-Vektor ligiert. Darauf folgten die Transformation in kompetente *E. coli* und die Klon-PCR zur Identifizierung positiver Klone. Ein positiver Klon wurde schließlich angezüchtet und eine Plasmidpräparation durchgeführt.

Ausgehend von dem oben beschriebenen pGEM-T Easy_Klon als Matrize wurde unter Verwendung modifizierter Primer ein Konstrukt von HA- $G\gamma_{13}$ in pcDNA31⁺ hergestellt – wie unter 4.1. beschrieben – und anschließend sequenziert.

Zur Expressionskontrolle wurde HA- $G\gamma_{13}$ im Immunoblot mit einem Anti-HA-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies) nachgewiesen. Dabei wurde so verfahren, wie es unter 4.2.1. für die anderen HA- $G\gamma$ -Isoformen ausgeführt ist. Der HA- $G\gamma_{13}$ -Westernblot ist in Abb. 4.6 dargestellt.

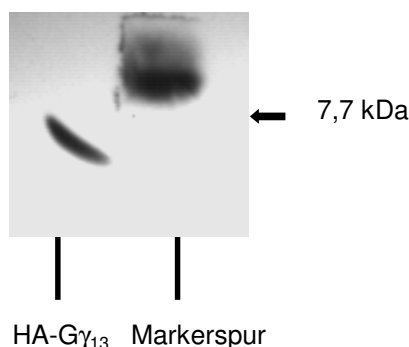


Abb. 4.6: Nachweis von HA- $G\gamma_{13}$ im Immunoblot mit einem Anti-HA-Antikörper

4.3. Ko-Immunpräzipitation von HA- $G\beta\gamma$ -Dimeren

Nachdem gezeigt wurde, dass die Expressionsvektoren, welche für die epitopmarkierten $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten kodieren, nach Transfektion Proteine der erwarteten Größe generierten, konnten die eigentlichen Immunpräzipitationsversuche durchgeführt werden. Mit Hilfe dieser Methode sollte in dieser Arbeit die Dimerisierung der $G\beta$ -Isoformen $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$, $G\beta_{3s}$, $G\beta_{3s2}$ und $G\beta_4$ mit den $G\gamma$ -Isoformen $G\gamma_1$, $G\gamma_2$, $G\gamma_3$, $G\gamma_4$, $G\gamma_5$, $G\gamma_7$, $G\gamma_{8c}$, $G\gamma_{10}$, $G\gamma_{11}$, $G\gamma_{12}$ und

G γ ₁₃ untersucht werden. Dem Dimerisierungsverhalten der G β ₃-Spleißvarianten G β _{3s} und G β _{3s2} wurde dabei besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Hierzu wurden zwei unterschiedliche Strategien gewählt. Zum einen wurden, basierend auf den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von E. Neer, die entsprechenden Isoformen getrennt *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. Nach der *in vitro*-Translation wurden G β - und G γ -Untereinheit zum Zweck der Dimerbildung inkubiert. Hierbei wurde für jede Versuchsreihe unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Translationseffizienzen der verschiedenen G γ -Isoformen ein Mischungsverhältnis gewählt, das gewährleistete, dass die G γ - gegenüber der G β -Untereinheit im Überschuss vorlag. Anschließend wurde die Immunpräzipitation durchgeführt (Mende et al., 1995).

Die korrekte Faltung von G β -Proteinen ist ein komplexer Prozess, der eine Reihe von interagierenden Proteinen wie den Chaperoninen erfordert (Mende et al., 1995). Das Retikulozytenlysat im *in vitro*-Translationsansatz enthält solche Chaperonine. Da aber die Bedingungen im Organismus in einem zellulären System besser nachgeahmt werden, wurde unter der Hypothese, dass die Dimerisierung unter *in vivo*-Bedingungen effizienter verlaufen könnte, ein Teil der Immunpräzipitationsversuche nach Transfektion humaner Zellen wiederholt.

Im Folgenden sollen zuerst die *in vitro*-Translationsversuche vorgestellt werden. Unter 4.3.2. wird dann auf die Ergebnisse der Immunpräzipitation von HA-G $\beta\gamma$ -Dimeren, die durch Kotransfektion von HEK-TSA-Zellen synthetisiert wurden, eingegangen.

4.3.1. Immunpräzipitation von durch *in vitro*-Translation hergestellten HA-G $\beta\gamma$ -Dimeren

Für eine Untersuchungsreihe wurden zunächst in getrennten Ansätzen die sechs verschiedenen G β -Isoformen, die zu untersuchende epitopmarkierte G γ -Isoform und die entsprechende G γ -Untereinheit ohne HA-Epitop in einem *in vitro*-Translationssystem hergestellt und gleichzeitig mit [³⁵S] Methionin markiert.

Zur Kontrolle der Translationseffizienz wurde den einzelnen Translationsmischungen am Ende der 90-minütigen Inkubationszeit jeweils ein Aliquot entnommen und in Probenpuffer erhitzt (s. 3.9.6). Die Proben wurden anschließend in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, autoradiographisch überprüft (s. Abb. 4.5) und mit einem *PhosphoImager* quantifiziert. Durch Zugabe von *in vitro*-Translationsmix konnte dann ggf. auf gleiche G β -Mengen adjustiert werden. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass für die Inkubation mit

dem HA-G γ -Protein vergleichbare Mengen der verschiedenen G β -Isoformen eingesetzt wurden.

Anschließend wurden jeweils 20 μ l G β -Translationsmischung mit einem definierten Volumen HA-G γ -Translationsmischung in einem solchen Verhältnis zusammengegeben, dass die epitopmarkierte G γ -Untereinheit gegenüber dem G β -Protein im molekularen Überschuss vorlag (Abschätzung aufgrund der *PhosphoImage* Analyse unter Berücksichtigung der sequenzabhängigen Einbaumöglichkeiten für Methionin).

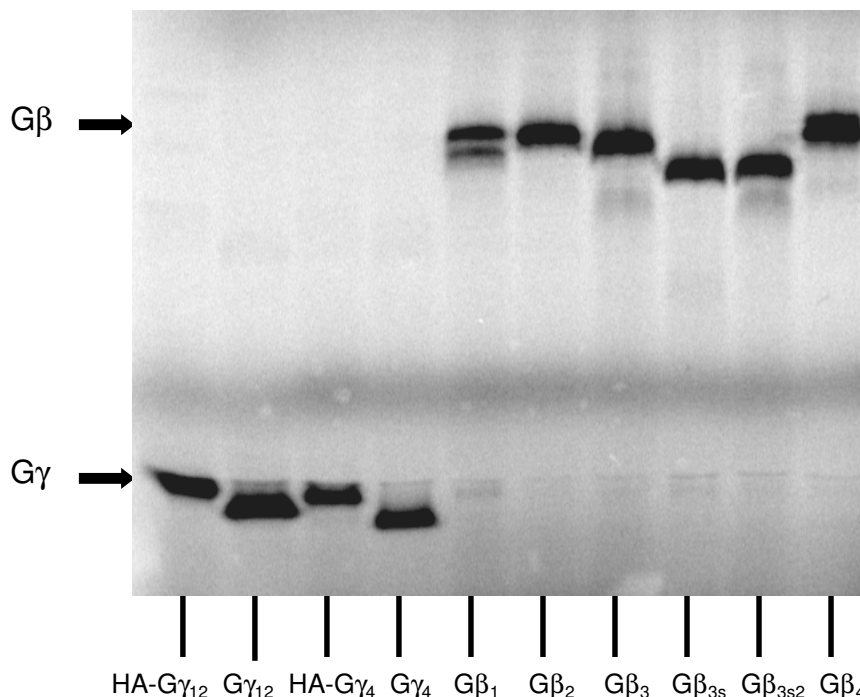


Abb. 4.5: Kontrollgel der Translationseffizienz von *in vitro* translatierten (HA-)G γ - und G β -Proteinen

Das Gel zeigt *in vitro* translatierte, nicht der Immunpräzipitation unterworfenen (HA-)G γ - und G β -Untereinheiten. In diesem Fall handelt es sich um ein Kontrollgel von zwei parallel durchgeführten Kopräzipitationsreihen mit HA-G γ ₁₂ und HA-G γ ₄, welches hier exemplarisch für alle routinemäßig zu jeder Versuchsreihe angefertigten Kontrollgele vorgestellt wird. Es ist zu erkennen, dass die G β -Proteine untereinander eine vergleichbare Translationseffizienz aufweisen. Gleichzeitig wurde auch die Translationseffizienz der (HA-)G γ -Proteine überprüft. Die Größenunterschiede zwischen den jeweiligen G γ -Isoformen mit bzw. ohne HA-Epitop sind gut zu erkennen.

Basierend auf den Untersuchungen von Schmidt und Neer (1991), wurden die *in vitro* translatierten G β - und G γ -Proteine zusammengeführt und 90 min lang bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation, wie unter 3.11.2.3. beschrieben. Der monoklonale Antikörper 12CA5 (Roche, Mannheim) erkennt das HA-Epitop. Ist es zwischen der epitopmarkierten G γ -Untereinheit und einer G β -Untereinheit zur Dimerbildung gekommen, wird die G β -Untereinheit kopräzipitiert und kann nach elektrophoretischer

Auftrennung durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden bei jeder Reihe Proben der jeweiligen HA-G γ -Isoform und des entsprechenden nicht-modifizierten G γ -Proteins, die beide nicht mit einem G β -Protein inkubiert wurden, als Kontrollproben mitgeführt.

4.3.1.1. Spezifitätskontrolle der Immunpräzipitationsexperimente

In einer ersten Versuchsserie wurde überprüft, dass der verwendete Antikörper nicht unspezifisch mit G β - oder G γ -Untereinheiten (d.h. in Abwesenheit der Epitopmarkierung) reagiert. Außerdem wurde untersucht, dass es nicht zu einer unspezifischen Bindung der untersuchten Komponenten an die Protein A-Agarose kommt. Hierfür wurden Immunpräzipitationen gemäß der Standardmethode mit folgenden Ansätzen durchgeführt:

(1) HA-G γ_2 und G β_1 , (2) G γ_2 und G β_1 , (3) G β_1 allein, (4) G β_2 allein, (5) G β_3 allein, (6) G β_{3s} allein, (7) G β_{3s2} allein und (8) G β_4 allein.

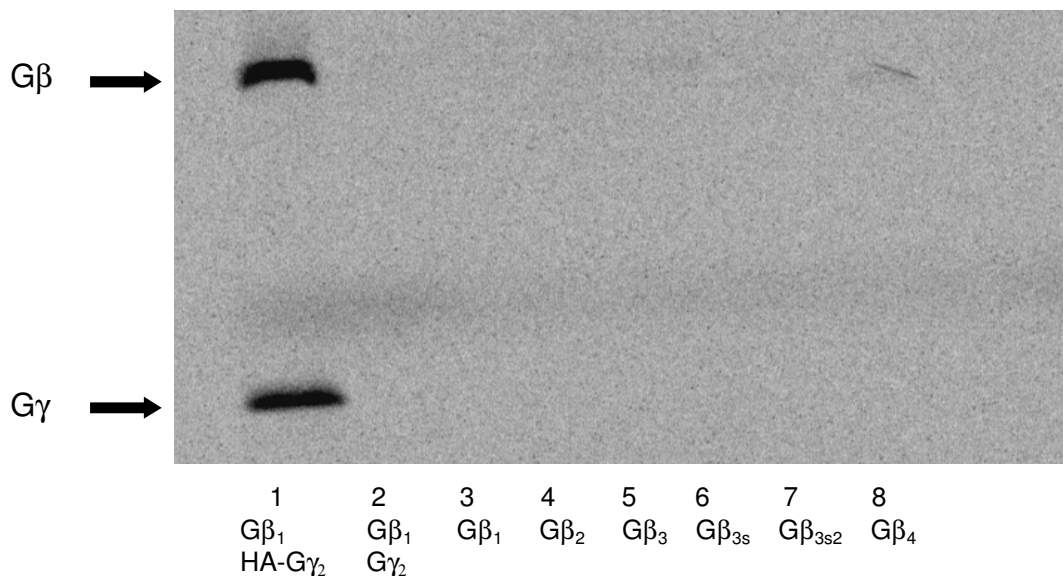


Abb. 4.6: Kontrollversuch zur Immunpräzipitation *in vitro* translaterter HA-G β γ -Dimere

Das Ergebnis dieses wichtigen Kontrollexperimentes zeigt Abb. 4.6: Auf der ersten Spur ist die Positivkontrolle des Versuches zu sehen: G β_1 wird durch die Interaktion mit HA-G γ_2 kopräzipitiert. Das Ergebnis auf Spur 2 macht deutlich, dass über G γ_2 ohne HA-Epitop keine Immunpräzipitation erfolgt, so dass hier weder G γ_2 noch G β_1 präzipitiert werden. Schließlich

ist auf den Spuren 3 bis 8 zu erkennen, dass ohne die Vermittlung einer HA-G γ -Untereinheit keine Immunpräzipitation der G β -Isoformen G β_1 , G β_2 , G β_3 , G β_{3s} , G β_{3s2} oder G β_4 stattfindet. Zusammengefasst zeigte dieses Kontrollexperiment, dass der Antikörper nur über das HA-Epitop mit den zu untersuchenden Proteinen reagiert. Erwartungsgemäß gelang es, das Dimer HA-G $\gamma_2\beta_1$ zu präzipitieren. Diese Experimente belegen, dass es unter den von uns gewählten Immunpräzipitationsbedingungen zu einer spezifischen Interaktion von G β - und G γ -Untereinheiten mit dem Anti-HA-Antikörper kommt. Hinweise auf unspezifische Reaktionen ergaben sich hierbei nicht.

4.3.1.2. Ko-Immunpräzipitation *in vitro* translaterter G β - und G γ -Proteine

Nach diesem wichtigen Kontrollexperiment konnte mit den eigentlichen Versuchsreihen begonnen werden, in welchen für jede G γ -Untereinheit ein Gel angefertigt wurde, auf das die Proben immer in der folgenden Reihenfolge aufgetragen wurden:

- (1) HA-G γ_x allein
- (2) HA-G γ_x + G β_1
- (3) HA-G γ_x + G β_2
- (4) HA-G γ_x + G β_3
- (5) HA-G γ_x + G β_{3s}
- (6) HA-G γ_x + G β_{3s2}
- (7) HA-G γ_x + G β_4
- (8) G γ_x allein

Abbildung 4.7 zeigt exemplarisch am Beispiel des G γ_{13} eine der elf Kopräzipitationsreihen. Die HA-G γ -Proteine sind auf allen folgenden Abbildungen in einem Bereich von 7 – 9 kDa zu sehen. Die G β -Isoformen G β_1 , G β_2 , G β_3 , und G β_4 weisen erwartungsgemäß ein Molekulargewicht von 35 – 37 kDa, die kurzen G β_3 -Varianten G β_{3s} und G β_{3s2} ein Molekulargewicht von 32 - 33 kDa auf.

Bei der Immunpräzipitation mit HA-G γ_{13} allein (Spur 1) wird kein in der Lösung befindliches Protein kopräzipitiert: Es kann also ausgeschlossen werden, dass es sich bei den auf den Bahnen 2 bis 7 sichtbaren Präzipitaten um andere Proteine als um die eingesetzten G β -Untereinheiten handelt.

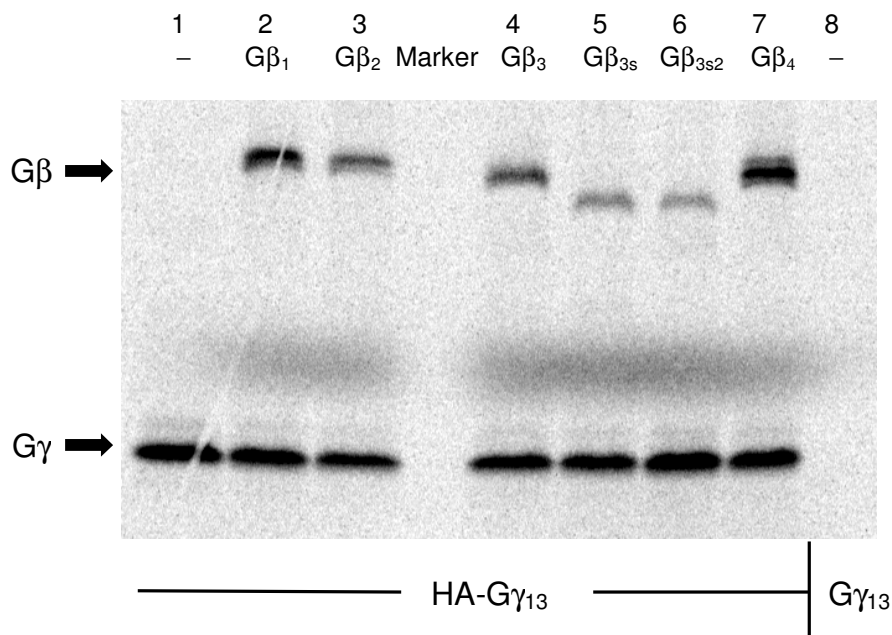


Abb. 4.7: Immunpräzipitation *in vitro* translaterter HA-G $\beta\gamma$ -Dimere: Interaktion von **G γ_{13}** mit den G β -Isoformen G β_1 , G β_2 , G β_3 , G β_{3s} , G β_{3s2} und G β_4

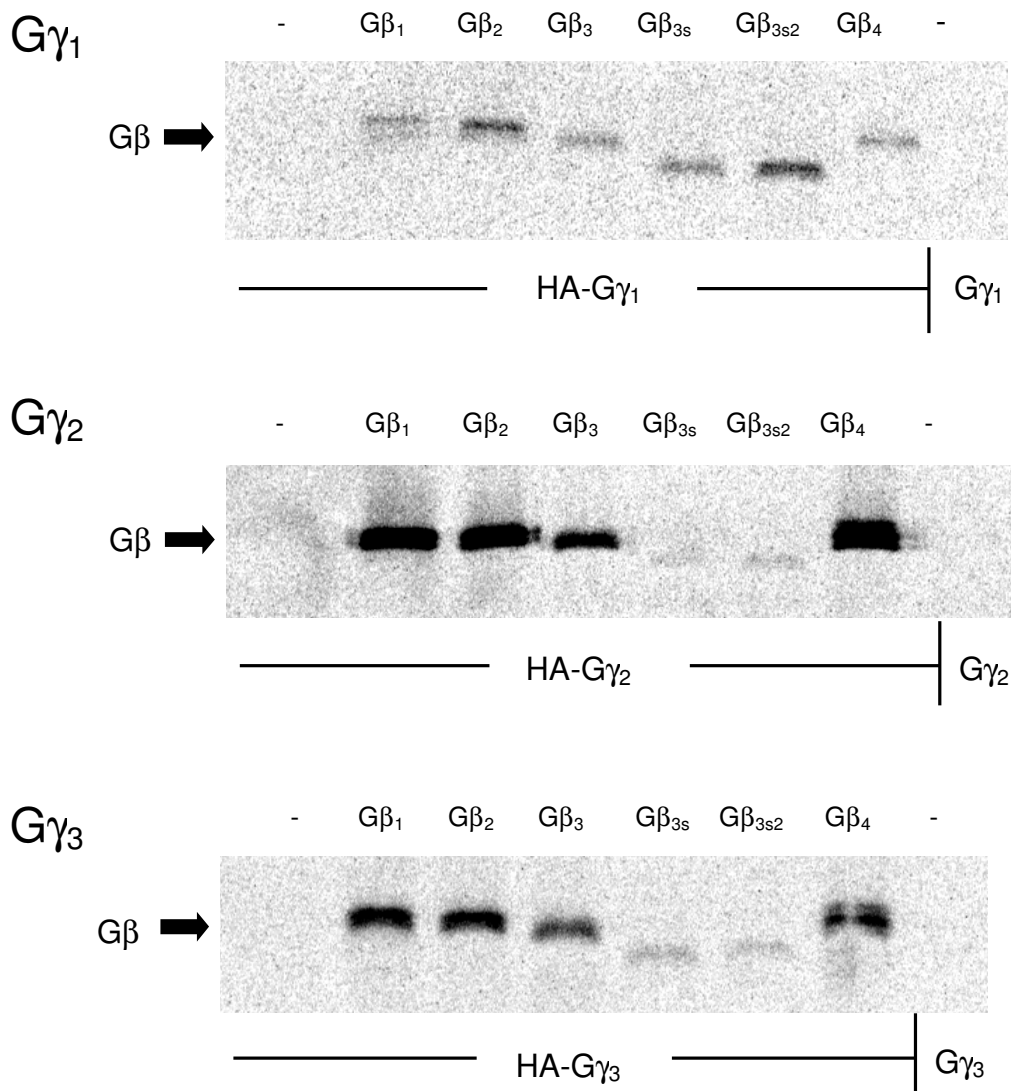
Wie der Abbildung 4.7 zu entnehmen ist, wurden mit HA-G γ_{13} zusammen G β_1 und G β_4 besonders effektiv kopräzipitiert, während diese Reaktion für die Isoformen G β_2 und G β_3 deutlich schwächer war. Die kurzen G β_3 -Isoformen G β_{3s} und G β_{3s2} weisen wiederum eine etwas weniger starke Bande als das Wildtyp-G β_3 -Protein auf.

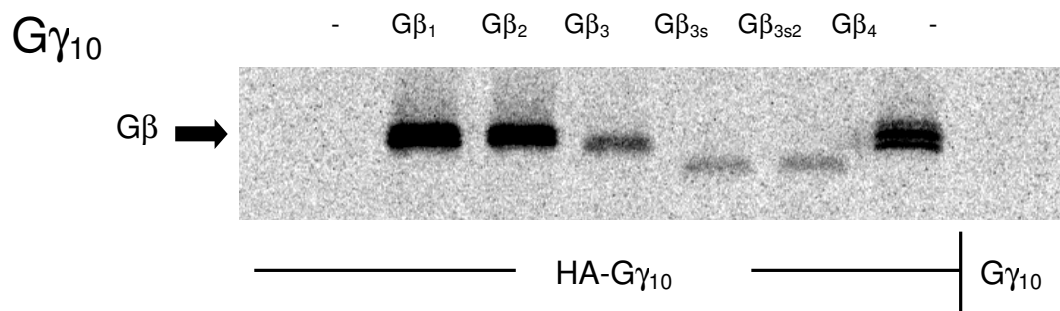
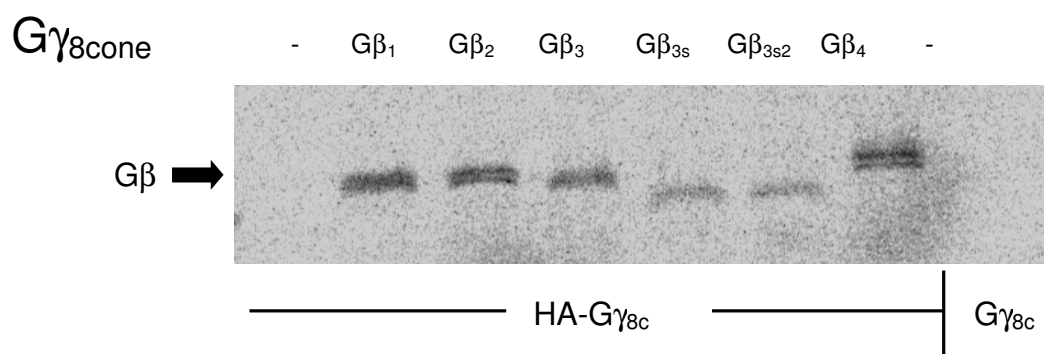
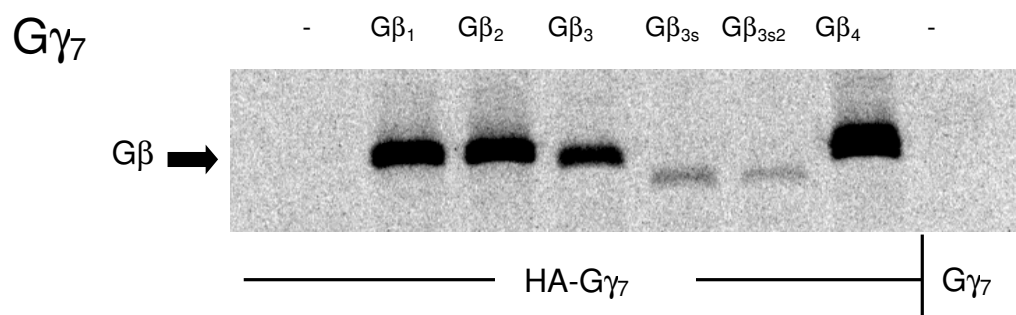
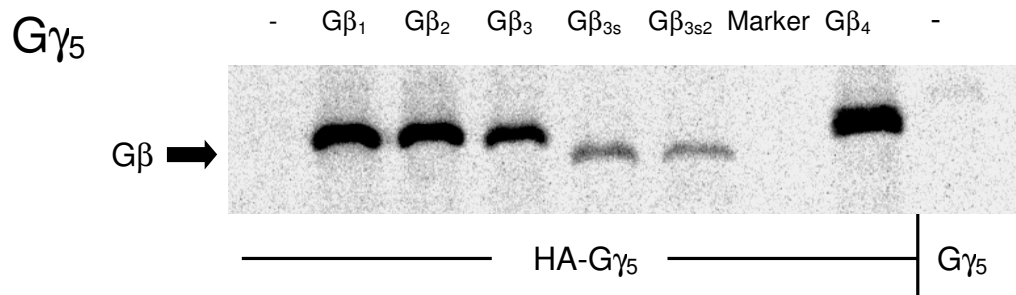
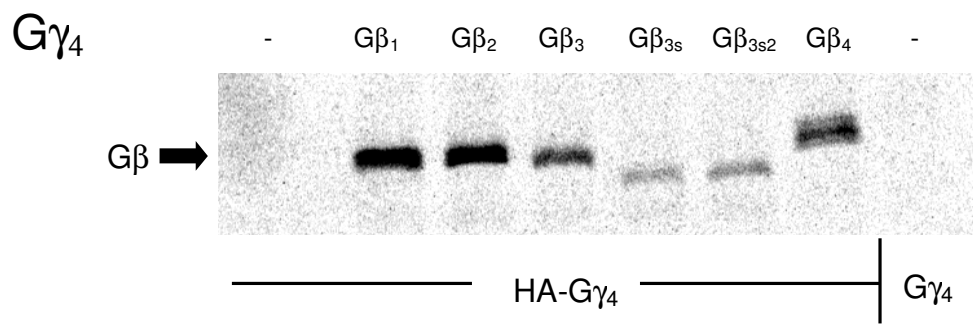
Daraus kann gefolgert werden, dass G γ_{13} mit allen hier untersuchten G β -Untereinheiten biochemisch interagieren kann. Am stärksten ist diese Interaktion bei G β_1 und G β_4 ausgeprägt, aber auch G β_3 und seine Varianten können mit G γ_{13} – obschon schwächer – präzipitierbare Dimere bilden.

Wie bereits erwähnt, wurde bei jeder Versuchsreihe ein nichtmarkiertes G γ -Protein mitgeführt. Wie aus Abb. 4.7 für G γ_{13} hervorgeht, reagiert der Antikörper nicht mit diesem nichtmodifizierten Protein. Auch bei allen anderen Untersuchungen erbrachte diese Negativkontrolle das erwartete Ergebnis, d.h. es kam zu keiner Präzipitation der Wildtyp-G γ -Untereinheit.

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse für die weiteren G γ -Isoformen dargestellt. Aus Platzgründen werden hierbei die G γ -Banden nicht mehr gezeigt und die Ergebnisse durch Darstellung der G β -Banden repräsentiert (Abb. 4.8).

Bei der eingehenden Analyse dieser Untersuchungen fällt auf, dass es unterschiedliche Präzipitationsmuster in Abhängigkeit von der untersuchten $G\gamma$ -Untereinheit gibt. So dimerisiert $G\gamma_1$ mit $G\beta_1$ und $G\beta_4$ und auch mit Wildtyp- $G\beta_3$ nur relativ schwach, mit $G\beta_2$ und den kurzen $G\beta_3$ -Isoformen $G\beta_{3s}$ und vor allem $G\beta_{3s2}$ sehr gut. Im Falle von $G\gamma_2$ dagegen ist eine gute Interaktion mit $G\beta_1$, $G\beta_2$ und $G\beta_4$ vorhanden, die Dimerisierung mit $G\beta_3$ ist deutlich schwächer, und die Banden von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ sind kaum auszumachen. Ein ähnliches Bild bietet sich auch bei der vergleichenden Betrachtung der Kopräzipitationsreihen mit $G\gamma_{10}$ und $G\gamma_{11}$: Hier dimerisiert $G\gamma_{10}$ gut mit $G\beta_1$ und $G\beta_2$, seine Interaktion mit $G\beta_3$ und seinen Spleißvarianten ist deutlich weniger ausgeprägt. Im Gegensatz dazu bildet $G\gamma_{11}$ gerade mit $G\beta_3$, $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ besonders gut Dimere, während es mit $G\beta_1$ und $G\beta_2$ wesentlich schwächer interagiert.





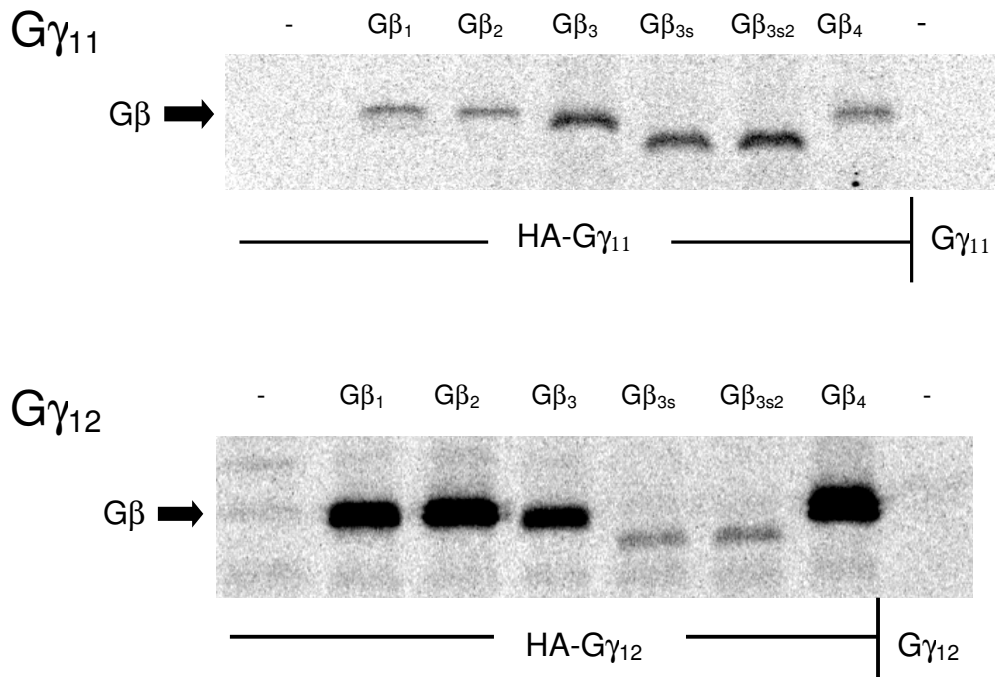


Abb. 4.8: Immunpräzipitation *in vitro* translaterter HA-G $\beta\gamma$ -Dimere

Dargestellt sind die Immunpräzipitationsreihen mit den G γ -Isoformen G γ_1 , G γ_2 , G γ_3 , G γ_4 , G γ_5 , G γ_7 , G γ_{8c} , G γ_{10} , G γ_{11} und G γ_{12} . (Das Ergebnis mit G γ_{13} wird in Abb. 4.7 gezeigt.) Es ist jeweils nur der Teil der Autoradiographie, auf dem die G β -Proteine zu sehen sind, abgebildet. Wie schon in den Erläuterungen zu Abb. 4.7 ausgeführt, wiesen die HA-G γ -Banden innerhalb einer Untersuchungsreihe jeweils die gleiche Stärke auf. Bei Präzipitationen mit G γ -Proteinen ohne HA-Epitop war in der Höhe, die dem Molekulargewicht von G γ -Untereinheiten entspricht, in keinem Fall eine Bande zu erkennen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass G β_{3s} und G β_{3s2} in vielen Kopräzipitationsreihen schwächere Banden ausbilden als die übrigen G β -Isoformen. Andererseits dimerisieren diese G β_3 -Varianten gut mit G γ_{8cone} und G γ_{13} und besonders stark mit G γ_1 und G γ_{11} .

Damit kann einerseits festgehalten werden, dass die Varianten G β_{3s} und G β_{3s2} trotz ihrer großen Deletion mit G γ -Untereinheiten präzipitierbare Dimere bilden können, also ein wichtiges Charakteristikum von G β -Proteinen erfüllen. Über die Gründe der meist schwächeren Kopräzipitation und der möglichen Selektivität wird im Abschnitt *Diskussion* weiter spekuliert werden. Zumindest aber fällt auf, dass – mit Ausnahme von G γ_{13} – die besser mit G β_{3s} und G β_{3s2} interagierenden G γ -Isoformen G γ_1 , G γ_{8cone} und G γ_{11} jene sind, die als einzige durch Farnesylierung statt durch Geranylgeranylierung modifiziert werden.

4.3.2. Kinetik der Dimerisierung von G β - und G γ -Varianten

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob die schwächere Interaktion der kurzen G β_3 -Varianten möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass diese eine andere Dimerisierungskinetik haben. Zu diesem Zweck wurden einige Zeitreihenexperimente durchgeführt.

Bei den eingangs gezeigten Experimenten betrug die Dimerisierungszeit 90 min. Diese Dauer beruht auf Arbeiten der Arbeitsgruppe von E. Neer, die in umfassenden kinetischen Untersuchungen für das Dimer aus G β_1 und HA-G γ_2 gezeigt hatte, dass in dieser Zeit die Dimerisierung *in vitro* translatierter Isoformen abgeschlossen ist (Garcia-Higuera et al., 1998).

Abbildung 4.9 zeigt die Ergebnisse für die G β -Dimerisierung mit HA-G γ_{12} . Den ersten vier Ansätzen (also den „Null-Minuten-Ansätzen“) wurden, um die Dimerisierungsreaktion zu stoppen, sofort 500 μ l eiskalten RIPA-Puffers zugefügt. Die anderen Dimerisierungsansätze wurden jeweils 10, 20, 30, 60, 90 bzw. 120 min lang bei 37°C inkubiert, bevor auch hier die Reaktion gestoppt wurde. Nach standardmäßiger Immunpräzipitation und *PhosphorImage* Analyse wurden die G β -Banden densitometriert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.9 unten graphisch dargestellt.

Es wird hierbei deutlich, dass G β_1 , G β_3 und G β_{3s} bezüglich ihrer Interaktion mit HA-G γ_{12} jeweils eine ähnliche Kinetik aufweisen, wobei die Kurven von G β_3 und G β_{3s} (B,C) schneller ihr Plateau erreichen als die G β_1 -Kurve (A). Auffällig ist, dass die Dimerisierung von G β_{3s2} mit HA-G γ_{12} eine ganz andere Kinetik besitzt (D): Sie erreicht ihr Plateau schon nach 20 min. Danach ist kein Zuwachs an G β_{3s2} -Präzipitat mehr festzustellen.

Zusammenfassend lässt sich aus dem Zeitreihenversuch schließen, dass eine Dimerisierungsdauer, die über die in dieser Arbeit standardmäßig angewandte Zeit von 90 min hinausgeht, für keines der hier untersuchten G $\beta\gamma$ -Dimere einen Zuwachs an G β -Präzipitat erbringt.

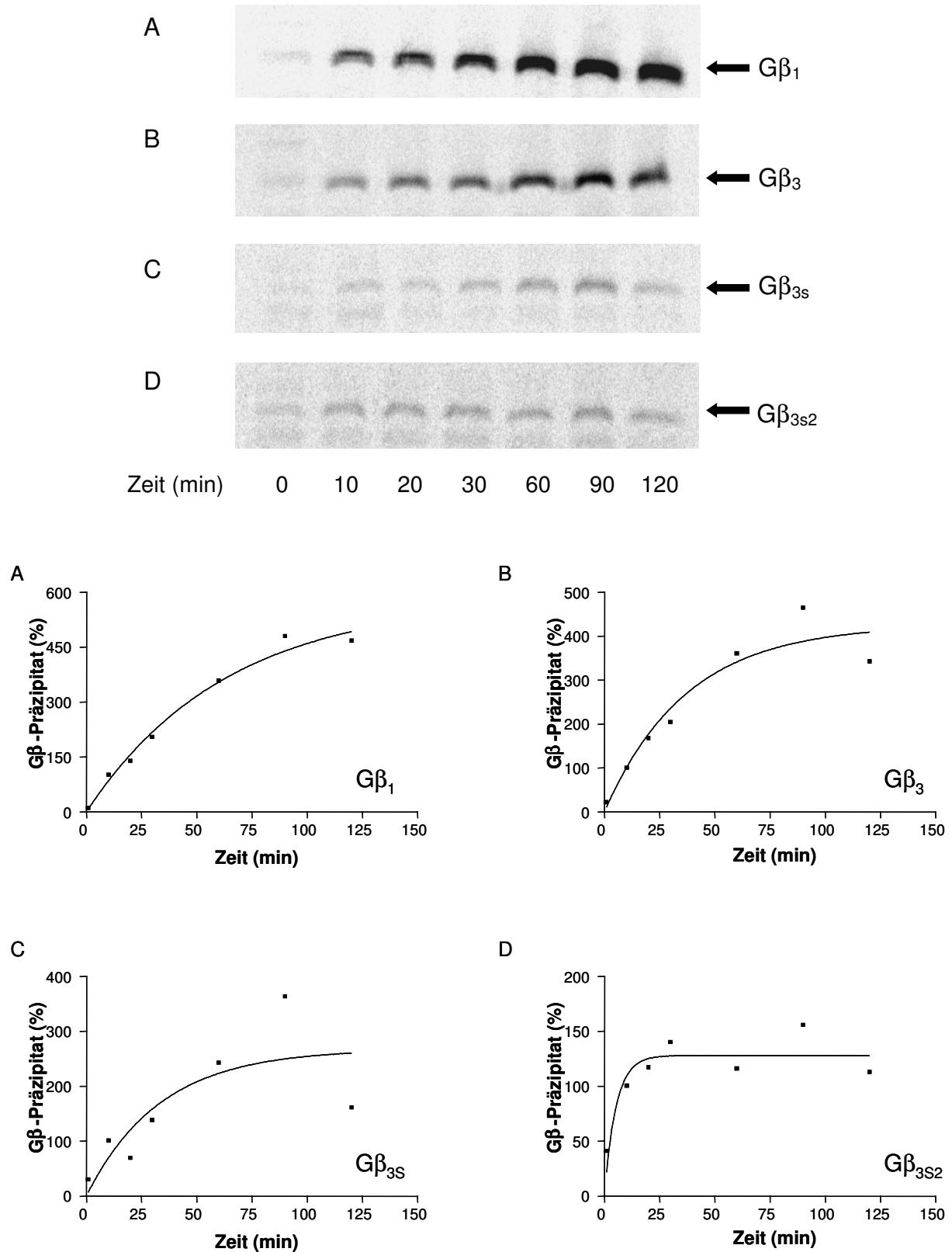


Abb. 4.9: Dimerisierungskinetik von HA-G γ_{12} mit den G β -Isoformen G β_1 , G β_3 , G β_{3s} und G β_{3s2}

Im oberen Teil der Abbildung sind die Autoradiographien der Zeitreihen für die G β -Isoformen G β_1 , G β_3 , G β_{3s} und G β_{3s2} dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung wird die Kinetik der Dimerisierung anhand von Graphen, die durch lineare Regressionsanalyse aus den Densitometriewerten der Autoradiographien generiert wurden, wiedergegeben. Die Ordinate gibt die Menge des nach der

jeweiligen Dimerisierungszeit kopräzipitierten G β -Proteins in Prozent wieder. Hierbei wurde bei jeder Reihe der 10-Minuten-Wert gleich 100% gesetzt. Diese Art der Darstellung erlaubt einen Vergleich der Zeitverläufe, mit denen die untersuchten G β -Isoformen mit HA-G γ_{12} dimerisieren, nicht aber einen Vergleich der absoluten Mengen der G β -Präzipitate untereinander.

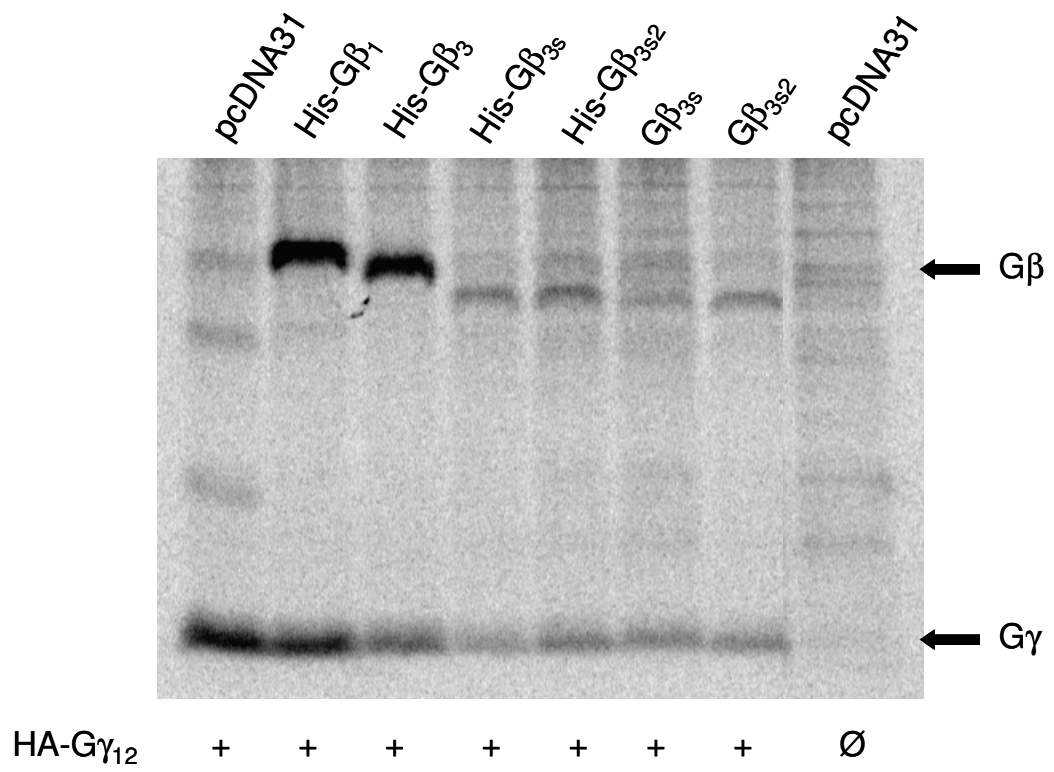
4.3.3. Immunpräzipitation von *in vivo* generierten G $\beta\gamma$ -Dimeren

Die bislang vorgestellten Ergebnisse bestätigen einerseits, dass die G β_3 -Varianten G β_{3s} und G β_{3s2} prinzipiell mit G γ -Untereinheiten immunpräzipitierbare Dimere bilden können. In den meisten Fällen ist die präzipitierte Menge von G β_{3s} und G β_{3s2} dabei allerdings wesentlich geringer als für die Wildtypvarianten. Die Dimerisierung von G β -Proteinen setzt zum einen die regelrechte Faltung der G β -Untereinheit voraus, die dann mit einer G γ -Untereinheit interagieren kann. *In vivo* – aber auch in Anwesenheit von Retikulozytenlysat, so die Untersuchungen der Gruppe von E. Neer (Mende et al., 1995) – sind weitere Proteine (z.B. Chaperonine) an der ordnungsgemäßen Prozessierung beteiligt. Da nicht auszuschließen ist, dass solche Prozesse *in vitro* anders verlaufen als *in vivo*, wurde ein Teil der Experimente nach Expression der Proteine *in vivo* wiederholt. Hierzu wurden die jeweiligen G-Protein-Untereinheiten transient in HEK-TSA-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden durch Zugabe der Aminosäuren Cystein und Methionin, die das radioaktive Isotop [^{35}S] trugen, metabolisch markiert. Nach Herstellung entsprechender Zelllysate erfolgte die Immunpräzipitation standardmäßig, wie es im Methodenteil unter 3.11.3.3. beschrieben wird.

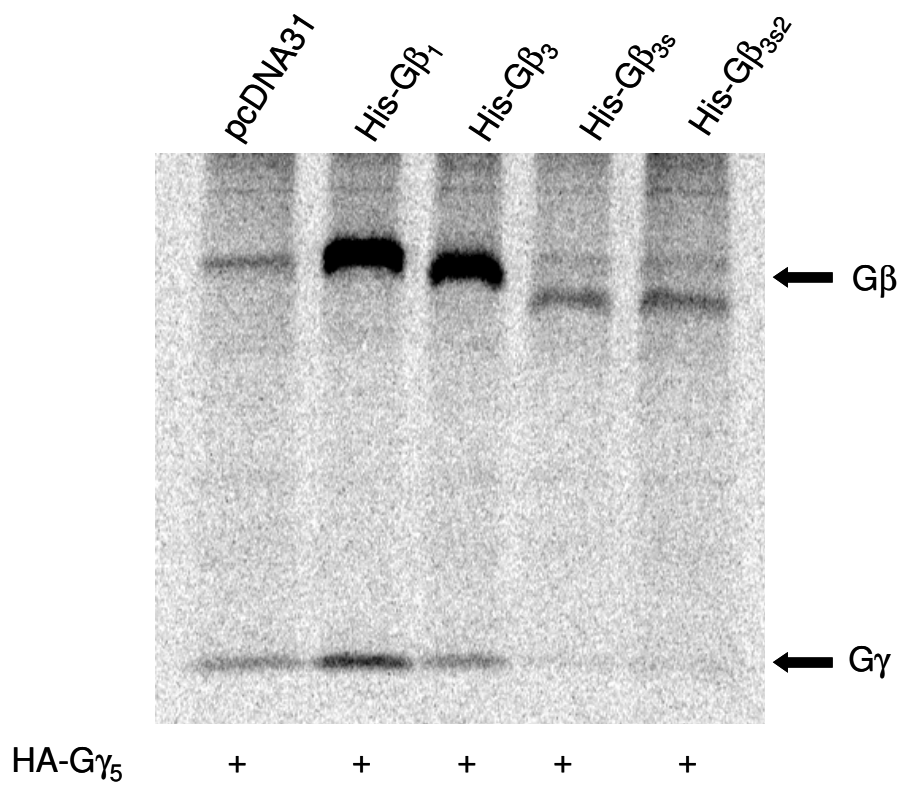
HEK-Zellen exprimieren natürlich eigene G β -Untereinheiten. Um endogen vorkommende G β -Proteine von den überexprimierten Varianten unterscheiden zu können, wurden letztere mit einem His-Epitop versehen. Arbeiten aus der Gruppe von E. Neer hatten gezeigt, dass diese Form der N-terminalen Markierung von G β -Proteinen keine Auswirkung auf ihre Funktionen, insbesondere keinen Effekt auf die Dimerisierung mit G γ -Untereinheiten hat (Mende et al., 1995). Diese Beobachtung konnte von uns bestätigt werden: In der in Abb. 4.10 gezeigten G γ_{12} -Reihe unterschieden sich die Mengen an präzipitiertem G β_{3s} und G β_{3s2} nicht sichtbar von den Mengen an präzipitiertem His-G β_{3s} und His-G β_{3s2} .

Im Einzelnen wurde mit dieser Methode die Interaktion der G β -Isoformen G β_1 , G β_3 , G β_{3s} und G β_{3s2} mit den G γ -Isoformen G γ_5 , G $\gamma_{8\text{cone}}$ und G γ_{12} untersucht. Repräsentative Autoradiographien der Kopräzipitationsversuche mit *in vivo* hergestellten HA-G γ -His-G β -Dimeren zeigt Abb. 4.10.

$G\gamma_{12}$



$G\gamma_5$



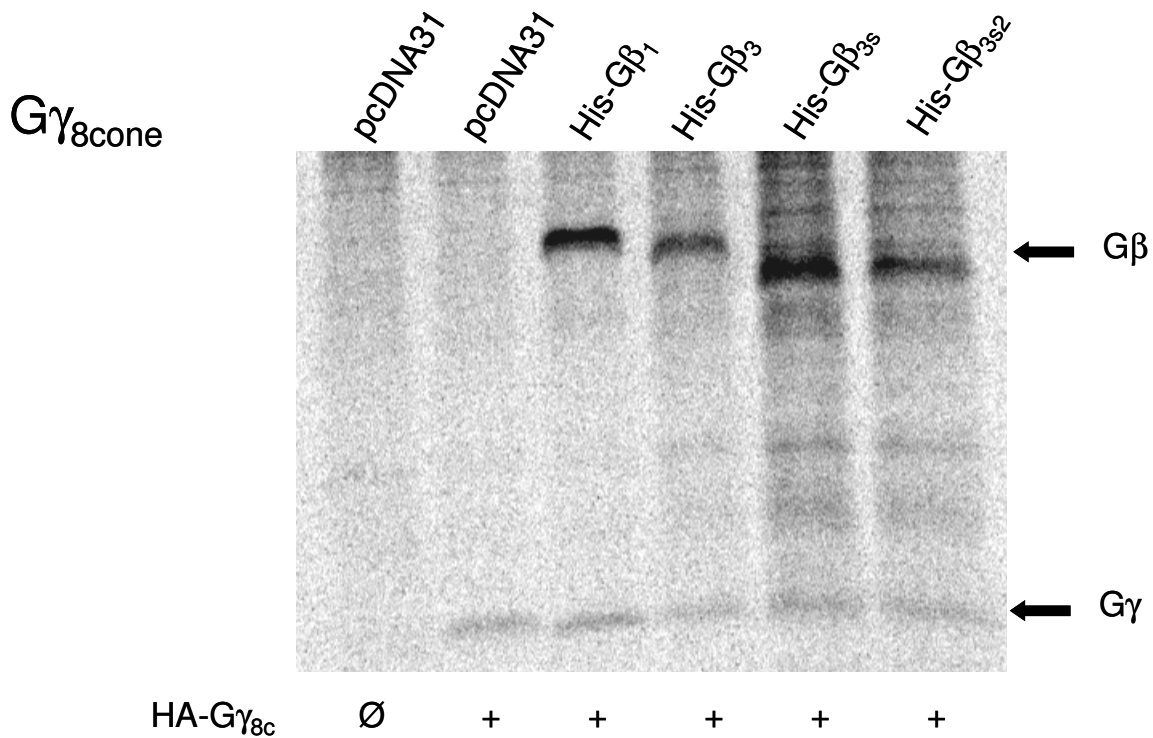


Abb. 4.10: Immunpräzipitation von HA-Gβγ-Dimeren nach Kotransfektion von HEK-TSA-Zellen

Gezeigt werden die Immunpräzipitationsreihen mit HA-Gγ₁₂, HA-Gγ₅ und HA-Gγ_{8cone}. Durch Vergleich mit der Lage der Markerproteine des vorgefärbten Molekulargewichtstandards (am linken Rand der HA-Gγ₁₂-Reihe angegeben) wird deutlich, dass die präzipitierten Proteine jeweils die erwartete Größe haben: His-Gβ₁ und His-Gβ₃ liegen bei 36 – 37 kDa, His-Gβ_{3s} bzw. His-Gβ_{3s2} bei 33 – 34 kDa und die HA-Gγ-Untereinheiten bei 7 – 8 kDa. Weil bei den kurzen Gβ-Isoformen eine Epitopmarkierung nicht notwendig ist, um sie von den endogenen Gβ-Proteinen abzugrenzen, wurde bei HA-Gγ₁₂ parallel mit Gβ_{3s} und Gβ_{3s2} mit bzw. ohne His-tag transfiziert. Da hierbei kein Unterschied in der Dimerisierungsintensität der His-Gβ-Proteine, verglichen mit den entsprechenden Gβ-Proteinen ohne His-tag, nachzuweisen war, wurden bei den weiteren Versuchen wegen der besseren Vergleichbarkeit His-Gβ_{3s} und His-Gβ_{3s2} eingesetzt.

Im Vergleich zu den Spuren, bei denen die Zellen nicht mit Gβ-Proteinen transfiziert wurden, findet sich bei allen untersuchten Gβ-Isoformen eine eindeutige Gβ-Präzipitationsbande der erwarteten Größe. Daneben sind auch Banden zu sehen, die am ehesten endogenen Gβ-Banden entsprechen, aber in ihrer Intensität weitaus schwächer sind als die Banden der überexprimierten Gβ-Proteine. Da sie kein His-Epitop tragen, wandern die zelleigenen Gβ-Proteine etwas schneller als His-Gβ₁ und His-Gβ₃. Die endogenen Gβ-Banden sind besonders gut bei Transfektion mit einer HA-Gγ-Untereinheit allein oder bei Kotransfektion mit den kurzen Gβ₃-Isoformen zu erkennen (am deutlichsten in der Gγ₅-Autoradiographie). Bei

alleiniger Transfektion mit leerem pcDNA31-Vektor, d.h. in Abwesenheit eines epitopmarkierten $G\gamma$ -Proteins, sind keine Präzipitationsbanden zu erkennen (diese Negativkontrollen wurden z.B. bei der gezeigten HA- $G\gamma_{12}$ - und HA- $G\gamma_{8\text{cone}}$ -Reihe durchgeführt).

Bei einer vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse von *in vitro*- und *in vivo*-Versuchsreihen fällt auf, dass die Dimerbildung von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ mit den entsprechenden $G\gamma$ -Proteinen in ganzen Zellen stärker ausgeprägt ist, als wenn die beiden Untereinheiten durch *in vitro*-Translation hergestellt werden. Dies gilt für alle durchgeführten Koprazipitationsreihen mit *in vivo* synthetisierten HA- $G\beta\gamma$ -Dimeren.

An dieser Stelle soll noch die Aufmerksamkeit auf ein weiteres Detail gelenkt werden. Die Expression der epitopmarkierten $G\gamma$ -Untereinheiten erfolgte natürlich für alle Ansätze mit der gleichen Vektor-DNA Menge. (Nur bei Transfektion mit „HA- $G\gamma$ allein“ wurde jeweils eine doppelt so große Menge an epitopmarkiertem $G\gamma$ in pcDNA31⁺ wie bei den anderen Ansätzen eingesetzt. Aus diesem Grund ist ein direkter Vergleich dieser HA- $G\gamma$ -Banden mit den anderen nicht möglich.). Die Transkription der $G\gamma$ - und die $G\beta$ -Konstrukte stand hierbei jeweils unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors. Dennoch fällt – besonders wenn man die Ergebnisse mit $G\gamma_5$ und $G\gamma_{12}$ ansieht – auf, dass die Banden, die dem präzipitierten epitopmarkierten $G\gamma$ -Protein entsprechen, in den Spuren mit den $G\beta_3$ -Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ deutlich schwächer sind als in den Spuren mit $G\beta_1$ oder $G\beta_3$. Auf diesen Punkt soll später noch einmal in der Diskussion eingegangen werden. Eine naheliegende Erklärung könnte in einem schnelleren Umsatz von überexprimierten $G\gamma$ -Untereinheiten liegen, die nicht dimerisierten, also keinen Partner fanden, oder deren Interaktion mit einem $G\beta$ -Protein weniger stabil ist (über entsprechende Ergebnisse berichteten auch Pronin und Gautam, 1993).

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass es unter Verwendung epitopmarkierter $G\gamma$ -Proteine möglich ist, eine Reihe von Aussagen zur biochemischen Interaktion von $G\beta$ -Proteinen mit den verschiedenen $G\gamma$ -Untereinheiten zu machen.

Wichtige Befunde sind, dass in diesem Testverfahren die Wildtyp- $G\beta$ -Untereinheiten $G\beta_1$ - $G\beta_4$ mit allen untersuchten $G\gamma$ -Untereinheiten interagieren können. In dieser Arbeit wurde dies zum ersten Mal umfassend für alle $G\gamma$ -Untereinheiten (mit Ausnahme des hochspezialisierten olfaktorischen $G\gamma$) untersucht. Weiterhin kann festgehalten werden, dass $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ trotz ihrer bemerkenswerten Deletion ebenfalls mit nahezu allen $G\gamma$ -

Untereinheiten präzipitierbare Dimere bilden können, auch wenn die Intensität dieser Dimerisierung meist deutlich schwächer ausfällt als bei den Wildtypproteinen.

Aufgabe der Diskussion wird es sein, diese neuen und z.T. unerwarteten Ergebnisse unter Berücksichtigung der bislang bekannten Daten zu $G\beta\gamma$ -Dimeren einzuordnen und zu werten.

5. Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Analyse, in wieweit die neu entdeckten $G\beta_3$ -Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ trotz einer erheblichen strukturellen Veränderung infolge der Deletion einer WD-Domäne grundlegende biochemische Eigenschaften der Wildtyp- $G\beta$ -Proteine besitzen. Die $G\beta_3$ -Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ werden mit dem 825T-Allel im entsprechenden $G\beta_3$ -Gen in Verbindung gebracht. Gleichzeitig wurde eine Anreicherung dieses *GNB3* 825T-Allels bei einer Reihe von Erkrankungen beobachtet. Im Folgenden soll diskutiert werden, wie die eigenen Ergebnisse mit den biochemischen Befunden zur $G\beta\gamma$ -Interaktion aus anderen Untersuchungen in Einklang zu bringen sind. Außerdem soll angerissen werden, wie die hier vorliegenden Ergebnisse mit den epidemiologischen Studien zum Phänotyp des *GNB3* 825T-Allels in Verbindung stehen.

Die grundlegende Eigenschaft von $G\beta$ -Proteinen, mit $G\gamma$ -Untereinheiten stabile Dimere zu bilden, wurde mit einem Ko-Präzipitationsverfahren untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das Wildtyp- $G\beta_3$ -Protein mit allen $G\gamma$ -Untereinheiten (mit Ausnahme des hochspezialisierten $G\gamma_{olf}$ aus dem Riechepithel, welches hier nicht untersucht wurde) immunpräzipitierbare Dimere bilden kann. Diese Ergebnisse sind neu, da entsprechende Untersuchungen für das $G\beta_3$ -Protein nie zuvor durchgeführt wurden. Ebenso konnten wir erstmalig zeigen, dass auch die anderen $G\beta$ -Isoformen der $G\beta_{1-4}$ -Familie, die als Kontrollproben mitgeführt wurden, mit allen anderen $G\gamma$ -Proteinen dimerisieren können. Diese Befunde sprechen dafür, dass prinzipiell alle hier untersuchten $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten auf biochemischer Ebene miteinander reagieren.

Aber nicht nur die Wildtyp-Proteine, sondern auch die $G\beta_3$ -Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ können mit nahezu allen anderen $G\gamma$ -Proteinen (außer $G\gamma_2$) immunpräzipitierbare Dimere bilden. Doch trotz dieser vielen qualitativen Gemeinsamkeiten unterscheidet sich der quantitative Grad der Dimerisierung zwischen den einzelnen Kombinationen erheblich.

Beim Vergleich der Dimerisierung von $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten, die durch *in vitro*-Translation im zellfreien System generiert wurden, mit der Dimerisierung in ganzen Zellen ergaben sich einige Unterschiede, die dafür sprechen, dass im zellulären Kontext die Prozessierung so komplexer Strukturen wie des $G\beta\gamma$ -Dimers effektiver verläuft. Deshalb sollen hier die Ergebnisse, welche mit den beiden unterschiedlichen Methoden erhoben wurden, erst einmal getrennt diskutiert werden.

5.1. Dimerisierung in vitro translatierter G β - und G γ -Proteine

Wie soeben angeführt, besitzen G β γ -Dimere eine recht komplexe Struktur. Man geht davon aus, dass für die regelrechte Faltung des G β -Propellers G γ -Proteine und Chaperonine vorhanden sein müssen. Chaperonine sind im Retikulozytenlysat, das für die *in vitro*-Translation verwendet wird, enthalten (Mende et al., 1995). Bei unseren Untersuchungen stellten wir fest, dass die G β -Isoformen G β_1 , G β_2 , G β_3 und G β_4 mit allen G γ -Untereinheiten immunpräzipitierbare Dimere bilden können. Interessanterweise war dabei die Interaktion der meisten G γ -Untereinheiten mit dem Wildtyp-G β_3 deutlich schwächer ausgeprägt als mit den G β -Isoformen G β_1 , G β_2 oder G β_4 (meist etwa 50% der Menge an immunpräzipitiertem G β_1). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die eingesetzten G β -Isoformen auf die gleiche spezifische Radioaktivität standardisiert wurden, so dass der Vergleich unterschiedlicher G β -Isoformen innerhalb eines Gels zulässig ist (dass für die verschiedenen Reihen jeweils unterschiedliche Mengen an G γ -Untereinheiten eingesetzt wurden, ist nicht von Bedeutung, da innerhalb einer Reihe jede G β -Isoform mit einem Aliquot der gleichen G γ -Präparation gemischt wurde). Ausnahmen von der Regel, dass G β_3 mit G γ -Proteinen eine geringere Menge präzipitierbare Dimere bildet als die anderen G β -Proteine, waren die G γ -Untereinheiten G γ_1 , G $\gamma_{8\text{cone}}$, G γ_{11} und G γ_{13} .

Auch die neu entdeckten G β -Isoformen G β_{3s} und G β_{3s2} waren in der Lage, mit fast allen untersuchten G γ -Isoformen präzipitierbare Dimere auszubilden – allein mit G γ_2 war eine Dimerisierung allenfalls nur andeutungsweise zu erkennen. Quantitativ betrachtet war die Menge an präzipitierbarem G β_{3s} oder G β_{3s2} jeweils meist deutlich geringer als die Menge des Wildtyp-G β_3 -Proteins (auch nach Korrektur für die Tatsache, dass G β_{3s} und G β_{3s2} aufgrund ihrer Deletionen weniger [^{35}S] Methionin inkorporieren können). So wiesen die den kurzen G β_3 -Varianten entsprechenden Banden jeweils nur ca. 1/8 bis 1/3 der Intensität der Wildtyp-G β_3 -Bande auf. Auch hier zeigten G γ_1 , G $\gamma_{8\text{cone}}$, G γ_{11} und G γ_{13} ein anderes Verhalten, welches im Folgenden näher diskutiert werden soll.

Von diesen vier G γ -Untereinheiten sind G γ_1 , G $\gamma_{8\text{cone}}$ und G γ_{11} besonders herauszustellen, da ihnen im Rahmen der posttranslationalen Modifikation eine C $_{15}$ -Farnesylgruppe an den C-Terminus angefügt wird. G γ_2 , G γ_3 , G γ_4 , G γ_5 , G γ_7 , G γ_{10} , G γ_{12} und G γ_{13} werden dagegen durch eine stärker lipophile C $_{20}$ -Geranylgeranylgruppe modifiziert (Ray et al., 1995; Ong et al., 1995; Balcueva et al., 2000). Es fällt ins Auge, dass in unseren Experimenten die drei farnesylierten G γ -Untereinheiten im Vergleich zu G β_3 schwächer mit G β_1 , G β_2 und G β_4

interagierten als die geranylgeranylierten $G\gamma$ -Isoformen. Auch mit den $G\beta_3$ -Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ konnten die farnesylierten $G\gamma$ -Untereinheiten besonders gut Dimere bilden. So wurde mit $G\gamma_1$ zusammen $G\beta_{3s2}$ am stärksten von allen untersuchten $G\beta$ -Isoformen präzipitiert. Dies war im Übrigen der einzige Fall, in dem sich $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ in ihrem Kopräzipitationsverhalten unterschieden. $G\gamma_{11}$ präzipitierte alle drei $G\beta_3$ -Varianten gleich gut und auch im Falle von $G\gamma_{8cone}$ kam es zu einer Kopräzipitation von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$, die etwa 50% der Wildtyp- $G\beta_3$ -Variante betrug.

Der Grund für die effektivere Interaktion der farnesylierten $G\gamma$ -Untereinheiten mit $G\beta_3$, $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ ist derzeit noch unklar. Ein direkter Kontakt zwischen dem Fettsäurerest und der $G\beta$ -Untereinheit ist aufgrund der bekannten Kristallstruktur des $G\beta\gamma$ -Dimers eher unwahrscheinlich, wobei allerdings die $G\gamma$ -Untereinheiten der kristallisierten $G\beta\gamma$ -Dimere keine Lipidmodifikation trugen (Sondek et al., 1996). Es ist daran zu denken, dass durch die etwas veränderte Prozessierung im Falle der Farnesylierung $G\beta_3$ -Varianten als Dimerisationspartner bevorzugt werden.

Allerdings muss auch daran gedacht werden, dass die farnesylierten $G\gamma$ -Untereinheiten – insbesondere beim Vergleich von $G\gamma_1$ und $G\gamma_{8cone}$ – eine hohe Homologie aufweisen, so dass auch Motive der Primärsequenz für das besondere Dimerisierungsverhalten verantwortlich sein könnten. Gegen die primäre Bedeutung der Lipidmodifikation spricht in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass $G\gamma_{13}$, ein geranylgeranyliertes Protein, vergleichsweise gut $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ präzipitierte. $G\gamma_{13}$ ist eine erst kürzlich entdeckte $G\gamma$ -Variante, welche die wenigsten Homologien zu den anderen $G\gamma$ -Isoformen besitzt (Huang et al., 1999).

Orientierende Sequenzvergleiche dieser vier $G\gamma$ -Untereinheiten haben bislang keine konservierten $G\gamma$ -Sequenzen erkennen lassen, welche die besonders effektive Interaktion mit $G\beta_3$ -Varianten erklären könnten.

Als Nächstes müssen wir uns der Frage zuwenden, wodurch die im Vergleich zur Wildtyp- $G\beta_3$ -Variante fast durchgängig schwächere Interaktion von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ mit $G\gamma$ -Untereinheiten hervorgerufen sein könnte. Vordergründig können die Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ aufgrund ihrer Deletionen etwas weniger [^{35}S] Methionin einbauen. Aber auch nach Korrektur für diesen Faktor bleibt die Beobachtung einer deutlich geringeren Kopräzipitation von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ mit den untersuchten $G\gamma$ -Varianten bestehen.

In allen Versuchsreihen lagen dabei die $G\gamma$ -Untereinheiten im deutlichen Überschuss vor, so dass nach den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Eva Neer die Dimerisierung besonders

effektiv verlaufen sollte (Li et al., 1998). Trotz stöchiometrisch vergleichbarer Mengen an $G\beta_3$ -Varianten, die wir in den Versuch einsetzten, beobachteten wir die beschriebenen Unterschiede in deren Dimerisierungsverhalten.. Folgende Hypothesen sind hierbei denkbar:

- a) Die Faltung und Prozessierung von $G\beta$ -Proteinen verlangt Hilfsproteine, u.a. Chaperonine und $G\gamma$ -Untereinheiten. Aufgrund der Deletionen in $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ könnte die Interaktion mit diesen Proteinen gestört und damit die Prozessierung in einem frühen Stadium gehemmt sein.
- b) Trotz korrekter Prozessierung des $G\beta$ -Propellers ist die Affinität von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ zu den verschiedenen $G\gamma$ -Untereinheiten schwächer, so dass mit ihnen weniger stabile $G\beta\gamma$ -Dimere ausgebildet werden.
- c) $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ benötigen eine längere Zeit zum Dimerisieren als die routinemäßig angewandten 90 min, welche von der Neer-Gruppe als optimale Zeit für die $G\beta\gamma$ -Dimerisierung anderer $G\beta$ -Proteine bestimmt worden war (Garcia-Higuera et al., 1998).
- d) Die $G\beta$ - $G\gamma$ -Interaktion verläuft auch im Falle von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ ungestört; die entstehenden Komplexe sind jedoch weniger stabil, so dass durch die vielen Waschschrte bei der Immunpräzipitation an HA- $G\gamma$ -Untereinheiten gebundenes $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ zum Teil wieder verloren geht.

Gegen die unter c) genannte Möglichkeit der langsameren Dimerisierungsgeschwindigkeit sprechen die Ergebnisse der unter 4.3.2. vorgestellten kinetischen Untersuchungen, bei denen die kurzen $G\beta_3$ -Varianten ihr (allerdings niedrigeres) Maximum der Dimerisierung sogar früher erreichten als die Wildtyp-Proteine.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es unklar, welche Mechanismen für die schwächere Ausprägung der $G\beta_{3s}\gamma$ - bzw. $G\beta_{3s2}\gamma$ -Interaktionen verantwortlich sind.

5.2. Interaktion von $G\beta_3$ -Varianten mit $G\gamma$ -Proteinen *in vivo*

Die Arbeitsgruppe von Eva Neer hatte in Kopräzipitationsversuchen mit rekombinanten $G\beta_1$ -Varianten, bei denen essentiell wichtige Aminosäuren des WD-Motivs mutiert worden waren, gefunden, dass in ganzen Zellen eine Dimerbildung dieser $G\beta$ -Untereinheiten mit $G\gamma$ -Untereinheiten möglich ist, welche mit *in vitro* translatierten Komponenten nicht beobachtet wurde (Garcia-Higuera et al., 1998). Wie erwähnt ist die Faltung des $G\beta$ -Propellers ein

komplexer Prozess, der Hilfsproteine erfordert. Solche Proteine sind zwar auch im Retikulozytenlysat enthalten. Es ist aber vorstellbar, dass Aktivität, Menge oder Kompartimentierung solcher Systeme in Lysaten weniger effektiv ist.

Wir wiederholten daher einen Teil der Immunpräzipitationsexperimente in einem zellulären System, indem wir G β -Untereinheiten und modifizierte G γ -Proteine durch Transfektion entsprechender Expressionskonstrukte in HEK-Zellen zur Expression brachten. Diese Zellen wurden anschließend metabolisch mit [³⁵S] Methionin markiert, um neu synthetisierte Proteine zu markieren.

In dieser Versuchsreihe beschränkte sich die Analyse auf die drei G β_3 -Varianten und die G β_1 -Isoform; diese wurden in den Zellen zusammen mit den G γ -Untereinheiten G γ_5 , G $\gamma_{8\text{cone}}$ und G γ_{12} exprimiert. G $\gamma_{8\text{cone}}$ ist hierbei der Vertreter der farnesylierten G γ -Proteine; es wird mit G β_3 in den Zapfen der Retina koexprimiert, und dem G $\beta_3\gamma_{8\text{cone}}$ -Dimer wird eine entscheidende Rolle beim Signaltransduktionsprozess des Farbsehens zugeschrieben (Ong et al., 1995). G γ_5 und G γ_{12} sind dagegen zwei ubiquitär exprimierte Vertreter der geranylgeranylierten G γ -Untereinheiten. In unserer Arbeitsgruppe war zuvor nachgewiesen worden, dass Dimere, welche sich aus G γ -Isoformen und aus G β_{3s} bzw. G β_{3s2} zusammensetzen, funktionell mit PTX-sensitiven G α -Untereinheiten interagieren (s. 5.4.; Siffert et al., 1998; Roskopf et al., 2002).

Im Rahmen dieser *in vivo*-Analysen stellten wir fest, dass wesentliche Ergebnisse der *in vitro*-Experimente gut reproduziert werden konnten. Alle transfizierten G β -G γ -Kombinationen führten zu präzipitierbaren G $\beta\gamma$ -Dimeren. Das bedeutet, dass G β_{3s} und G β_{3s2} auch unter *in vivo*-Bedingungen in der Lage sind, immunpräzipitierbare Dimere mit G γ_5 , G $\gamma_{8\text{cone}}$ und G γ_{12} zu bilden. Auch hier wurde mit den genannten HA-markierten G γ -Untereinheiten jeweils mehr G β_1 als G β_3 präzipitiert. Im Falle von G γ_5 und G γ_{12} bestand darüber hinaus die Abstufung, dass G β_3 besser kopräzipitiert wurde als seine Varianten. Dagegen war im Fall von G $\gamma_{8\text{cone}}$ die Interaktion mit allen drei G β_3 -Varianten gleich stark.

Abschließend soll noch auf einen interessanten Befund dieser *in vivo*-Versuchsreihe hingewiesen werden. Für die Transfektion aller rekombinanten G-Protein-Untereinheiten wurde der gleiche Expressionsvektor – pcDNA31⁺ – verwendet. Die Transkription stand dabei jeweils unter Kontrolle des starken CMV-Promotors und die Translation war jeweils durch die Verwendung einer Kozak-Sequenz optimiert. Wurden HA-G γ -Untereinheiten alleine exprimiert (Kontrollproben), so wurde die doppelte Menge an Vektor-DNA, die für das HA-G γ kodierte, verwendet, um die Gesamtmenge an zu transfizierender DNA konstant

zu halten. Obwohl also in allen G β -G γ -Proben mit der gleichen Menge an HA-G γ -Vektor-DNA transfiziert wurde, unterschied sich die Menge an präzipitiertem HA-G γ erheblich (s. Abb. 4.10). Insbesondere im Falle von HA-G γ_5 und HA-G γ_{12} war bei Koexpression und anschließender Präzipitation mit G β_{3s} und G β_{3s2} die Menge an präzipitiertem HA-G γ_5 bzw. HA-G γ_{12} am geringsten. Da, wie berichtet, Unterschiede in Transkription oder Translation unwahrscheinlich sind, könnte man spekulieren, dass in den Fällen, in denen es zu keiner ausreichenden G β -G γ -Dimerisierung kommt, überschüssiges G γ , das keinen Partner gefunden hat, abgebaut wird (inwiefern, was nahe liegt zu vermuten, auch nicht dimerisiertes G β degradiert, wird, darüber lässt sich anhand des vorliegenden Kopräzipitationssays keine Aussage treffen). Zu dieser Hypothese würde passen, dass im Falle von G $\gamma_{8\text{cone}}$, bei dem die präzipitierten Mengen an G β_3 , G β_{3s} und G β_{3s2} vergleichbar waren, Unterschiede in den G γ -Banden nicht auffielen. Die prominenten G γ -Banden in den Spuren, in denen kein G β exprimiert wird, sind wahrscheinlich durch den Einsatz der doppelten Menge an Vektor-DNA zu erklären. Somit würden diese Experimente nahe legen, dass überexprimierte G γ -Untereinheiten, die auf Grund einer schlechteren Interaktion mit G β_{3s} oder G β_{3s2} keinen Partner finden oder bei denen die Prozessierung nicht ordnungsgemäß erfolgt, verstärkt abgebaut werden. Alternativ ist zu überlegen, dass Dimere mit G β_{3s} bzw. G β_{3s2} an sich weniger stabil sind und schneller abgebaut werden. Über ähnliche Ergebnisse berichteten auch Pronin und Gautam, die in *pulse chase*-Experimenten feststellten, dass G γ_3 nach alleiniger Überexpression rasch degradiert wird, während die Koexpression von G β_1 mit G γ_3 den Abbau des G γ -Proteins – vermutlich aufgrund der Dimerbildung – vor einem Abbau bewahrt (Pronin und Gautam, 1993).

Insgesamt belegen diese Experimente, dass die G β_3 -Varianten G β_{3s} und G β_{3s2} in der Lage sind, mit fast allen G γ -Untereinheiten präzipitierbare Dimere zu bilden. Dabei scheint die Dimerisierung in einem zellulären System effektiver zu verlaufen als unter *in vitro*-Bedingungen. Diese Befunde sprechen dafür, dass G β_{3s} und G β_{3s2} tatsächlich wesentliche Charakteristika einer G β -Untereinheit erfüllen. Andererseits kann der wesentlich geringere Grad der Dimerbildung von G β_{3s} und G β_{3s2} mit den meisten G γ -Untereinheiten nicht übersehen werden. Auf die funktionellen Auswirkungen im Hinblick auf den durch das *GNB3* 825T-Allel definierten Phänotyp soll in einem späteren Abschnitt noch eingegangen werden.

5.3. G β -G γ -Spezifitäten – Was ist gesichert?

Nachdem im vorangehenden Kapitel diskutiert wurde, dass G β_{3s} und G β_{3s2} das Charakteristikum von G β -Proteinen besitzen, mit G γ -Proteinen stabile Dimere zu bilden, soll im Folgenden auf die Spezifitäten dieser Dimerbildung eingegangen werden.

Im Falle von G β_{3s} und G β_{3s2} sind die hier vorgestellten Untersuchungen die Ersten, die diese grundlegende biochemische Eigenschaft dieser G β -Proteine überprüften. Dagegen ist das Dimerisierungsverhalten von Wildtyp-G β_3 – wie auch das von G β_1 , G β_2 und G β_4 – mit einigen G γ -Isoformen zuvor schon von einer Reihe von Arbeitsgruppen untersucht worden. Dabei erbrachten die verschiedenen Methoden zum Teil widersprüchliche Ergebnisse (unter 2.5. werden die einzelnen Methoden kurz erklärt):

Bei der Untersuchung der Interaktion von G β_1 bis G β_5 mit den G γ -Isoformen G γ_1 , G γ_2 , G γ_3 , G γ_4 , G γ_5 und G γ_7 mit Hilfe des *yeast two-hybrid* Systems konnte eine Dimerbildung von G β_3 mit allen untersuchten G γ -Untereinheiten nachgewiesen werden (Yan et al., 1996). Das durch die G β_3 -G γ -Dimerisierung hervorgerufene Signal war (mit Ausnahme von G γ_1) jeweils schwächer als die Signale mit G β_1 oder G β_2 , wobei die Signalintensität von G β_4 zwischen den durch G β_1 und G β_3 induzierten Signalstärken lag. Interessanterweise ist G β_3 bezüglich seiner Aminosäuresequenz mit G β_1 , G β_2 und G β_4 nur zu 78 – 81 % identisch, wogegen die letzteren drei G β -Isoformen untereinander jeweils 86 – 88 % Identität aufweisen (Downes und Gautam, 1999). Das könnte das abweichende Dimerisierungsverhalten von G β_3 ein Stück weit erklären. Die Resultate von Yan et al. sind mit unseren – bis auf eine stärkere G $\beta_4\gamma_3$ -Dimerbildung, die wir fanden – in gutem Einklang.

Zu ganz anderen Ergebnissen kamen Arbeitsgruppen, welche die Interaktion von G β_3 mit G γ -Proteinen mit Hilfe der Trypsinierungsmethode, die als sehr spezifisch für den Nachweis eines korrekt gefalteten G $\beta\gamma$ -Dimers gilt, untersuchten. G β -Proteine enthalten in ihrer Aminosäuresequenz eine Vielzahl von Erkennungssequenzen für die Protease Trypsin, welche G β -Proteine daher in viele Fragmente spalten kann. Nach der Faltung in einen „G β -Propeller“, welche in Anwesenheit einer G γ -Untereinheit geschieht, kommen alle Trypsinierungsstellen – mit einer einzigen Ausnahme – im Inneren des Proteins zu liegen. Daher wird nach Dimerisierung nur ein kurzes Fragment des G β -Proteins abgespalten – so zumindest ausführliche Untersuchungen an G β_1 und G β_2 , die von der Arbeitsgruppe Eva Neer durchgeführt wurden. Im Analogschluss wurde diese Methode auch auf G β_3 übertragen. Dabei fiel auf, dass G β_3 weder in Kombination mit G γ_1 , G γ_2 , G γ_3 , G γ_4 , G γ_7 , G γ_{10} , G γ_{11} noch mit G γ_{13} vor tryptischem Verdau geschützt war (Schmidt et al., 1992; Ray et al., 1995; Huang

et al., 1999). Allein im Falle des $G\beta_3\gamma_5$ -Dimers war das für den Nachweis der Dimerbildung geforderte 24 kDa-Fragment schwach zu erkennen (Richardson und Robishaw, 1999). Zu der Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen, dass $G\beta_3$ mit all diesen $G\gamma$ -Isoformen keine stabilen Dimere ausbilden könne, stehen allerdings sowohl zahlreiche Befunde von funktionellen Untersuchungen als auch unsere Ergebnisse im Widerspruch: So konnte gezeigt werden, dass Dimere, die aus $G\beta_3$ und $G\gamma_4$, $G\gamma_5$ bzw. $G\gamma_{11}$ bestehen, die Interaktion von $G\alpha_i$ mit dem β_2 -Adrenozeptor unterstützen (Richardson und Robishaw, 1999). Dimere von $G\beta_3$ mit $G\gamma_2$ bzw. $G\gamma_{11}$ waren in der Lage, einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle (GIRK) zu aktivieren (Lei et al., 2000). Darüber hinaus wurde an ganzen Zellen nach Injektion von *antisense*-Oligonukleotiden der Nachweis erbracht, dass muskarinische M_4 -Acetylcholinrezeptoren Signale selektiv über G-Proteine, an deren Aufbau das $G\beta_3\gamma_4$ -Dimer beteiligt ist, vermitteln (Kleuss et al., 1993). Zusammenfassend bleibt somit festzuhalten, dass die Untersuchung, ob eine $G\beta$ -Untereinheit in Anwesenheit eines $G\gamma$ -Proteins vor der Trypsinierung geschützt ist, unzuverlässig ist. Es ist gut vorstellbar, dass in Abhängigkeit vom $G\beta$ -Protein und der Interaktion mit einer spezifischen $G\gamma$ -Untereinheit weitere Trypsinierungsstellen im $G\beta$ -Protein für die Protease zugänglich sind. Wird an einer solchen Stelle gespalten, dann kann es zum Komplettverdau des Proteins kommen. Damit ist der Nachweis, dass ein $G\beta\gamma$ -Dimer vor der Trypsinierung geschützt wird, zwar ein Beleg für die Existenz dieser $G\beta\gamma$ -Kombination. Der Umkehrschluss ist aber offensichtlich nicht erlaubt.

Die Kopräzipitationsanalyse ist daher – wie das *yeast two-hybrid* System – im Gegensatz zu den Trypsinierungsexperimenten eine sehr sensitive Methode, mit welcher auch quantitativ schwächere $G\beta\gamma$ -Dimerbildungen nachgewiesen werden können. In den hier vorgestellten *in vitro*-Immunpräzipitationsversuchen ist für nahezu alle untersuchten $G\beta\gamma$ -Kombinationen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Interaktion zu sehen. Dies spricht dafür, dass auf biochemischer Ebene eine Vielzahl von $G\beta\gamma$ -Dimeren existieren können. Dabei ist unklar, ob a) alle diese Dimere eine ordnungsgemäße Faltung aufweisen und b) ob solche Dimere auch funktionell mit Rezeptoren, $G\alpha$ -Untereinheiten und Effektoren interagieren können. Für ein Signal im *yeast two-hybrid* System oder für die Kopräzipitation von $G\beta\gamma$ -Dimeren ist eine mehr oder weniger feste Bindung von $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten erforderlich. Dies besagt jedoch nicht, dass die Struktur in allen Aspekten korrekt ausgebildet wird, so dass eine effektive Interaktion mit weiteren Bindungspartnern ermöglicht wird.

Insgesamt fällt beim Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen auf, dass biochemische Analyseverfahren (Kopräzipitation; Rekonstitution von Effektorsystemen) bzw.

Verfahren, die auf der Überexpression der G-Proteinuntereinheiten beruhen (*yeast two hybrid* System, Analyse von Effektorsystemen nach Überexpression von G-Proteinkomponenten), keinen Anhalt für eine besondere Spezifität der $G\beta\gamma$ -Dimersierung oder der Effektoraktivierung erbringen. Andererseits ergaben zellphysiologische Analysen mit Hilfe der *antisense*-Technik deutliche Hinweise für eine hohe Selektivität bestimmter $G\beta\gamma$ -Dimere bei der Effektoraktivierung, ausgehend von spezifischen Rezeptoren. So wurde gefunden, dass der muskarinerge M_4 -Acetylcholinrezeptor über das Dimer $G\beta_3\gamma_4$ an spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle koppelt, während der Somatostatinrezeptor hierzu $G\beta_1\gamma_3$ benötigt (Kleuss et al., 1993). Die von M_1 -Acetylcholinrezeptoren initiierte Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ wird über G-Protein-Komplexe, welche das Dimer $G\beta_1\gamma_4$ oder $G\beta_4\gamma_4$ enthalten, vermittelt (Dippel et al., 1996).

Somit bleibt festzuhalten, dass die hier gezeigten Präzipitationsergebnisse einerseits charakteristische biochemische Funktionen von $G\beta_3$, $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ belegen, dass andererseits aber in weiteren Untersuchungen die funktionelle Bedeutung für die jeweilige Signaltransduktion z.B. durch *antisense*-Methoden, Verwendung von siRNA-Molekülen oder anderen genetischen Ansätzen weiter aufgeklärt werden muss. Leider gibt es hierzu bislang nur wenige Daten.

5.4. $G\beta_{3s}$, $G\beta_{3s2}$ und der Phänotyp einer gesteigerten Signaltransduktion

Abschließend wollen wir uns mit der Frage beschäftigen, wie die hier gefundenen Ergebnisse zu den bisherigen Befunden über die $G\beta_3$ -Varianten $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ passen.

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, existiert ein Polymorphismus (C825T) im Gen der G-Protein-Untereinheit $G\beta_3$, der mit dem Auftreten zweier Spleißvarianten, $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$, assoziiert ist (Siffert et al., 1998; Rosskopf et al., 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass mit dem C825T-Polymorphismus weitere Polymorphismen im gesamten *GNB3*-Gen in engem Kopplungsungleichgewicht stehen (Rosskopf et al., 2002). Modelliert man die prä-mRNA beider Allele, so wird deutlich, dass sich die Sekundärstruktur der 825T- und 825C-mRNA Spezies erheblich voneinander unterscheiden (Rosskopf et al., 2002). Hieraus lässt sich ein genotypabhängiges Spleißen erklären, welches dann die Voraussetzung für die Entstehung von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ ist.

Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung des 825T-Alleles sei noch einmal darauf verwiesen, dass die Identifizierung dieses Allels von Zellen ausging, die einen Phänotyp exprimieren, der durch eine besonders effektive Signaltransduktion über PTX-sensitive G-Proteine charakterisiert ist (Siffert et al., 1998).

Fasst man diese Beobachtungen zusammen, so liegt die Vermutung nahe, dass die genotypabhängige Expression der Spleißvarianten $G\beta_{3s}$ und/oder $G\beta_{3s2}$ ursächlich an der Entstehung der gesteigerten Signaltransduktion beteiligt ist.

Trifft die Annahme zu, dass $G\beta_{3s}$ und/oder $G\beta_{3s2}$ trotz ihrer beträchtlichen strukturellen Modifikationen als G-Proteinuntereinheiten funktionell aktiv sind, so müssen sie wesentliche Charakteristika von $G\beta$ -Proteinen im System der G-Protein-vermittelten Signalübertragung erfüllen. Die Dimerisierung mit $G\gamma$ -Proteinen, die hier gezeigt wurde, ist ein wesentliches Element davon.

Die Deletionen von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ betreffen jeweils unterschiedliche Äquivalente einer ganzen WD-Domäne (Siffert et al., 1998; Roskopf et al., 2003). Zahlreiche Beispiele von Proteinen, die nur sechs WD-Domänen besitzen, aber dennoch eine kondensierte (Propeller-?) Struktur aufweisen, wurden publiziert, z.B. Sec13, ein am Vesikeltransport beteiligtes Hefeprotein, dessen Kristallstruktur bekannt ist (Saxena et al., 1996), oder Mak11, ein bei der RNA-Prozessierung in Hefezellen involviertes Protein (Neer et al., 1994). Daher steht zu vermuten, dass auch $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ eine Faltung einnehmen, die mit einem sechsblättrigen Propeller gut vereinbar ist.

Aus den Kristallisierungsdaten des $G\beta_1\gamma_2$ -Dimers kennt man die Kontaktstellen der $G\beta$ - mit der $G\gamma$ -Untereinheit. Neben den Interaktionen im Bereich beider N-terminaler coiled-coil Domänen schmiegt sich die $G\gamma$ -Untereinheit an die Propellerblätter 5, 6 und 7 (Sondek et al., 1996). Durch die Deletionen in $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ werden diese essentiellen Interaktionspunkte zwischen $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit nicht zerstört (Siffert et al., 1998; Roskopf et al., 2003). Auch wenn diese Interaktionspunkte an der Oberfläche des $G\beta$ -Torus erhalten bleiben sollten, ändert sich natürlich durch die höhere Kondensation eines sechsblättrigen Propellers ihre Position. Zusammengefasst würde dies eine gute strukturelle Erklärung bieten, wie es zu den in dieser Arbeit beschriebenen Dimeren kommt, die jedoch bei vielen $G\beta_{3s}G\gamma$ - bzw. $G\beta_{3s2}G\gamma$ -Kombinationen schwächer ausfallen.

Weitere Arbeiten der Arbeitsgruppe Siffert haben nachgewiesen, dass nach Überexpression von $G\beta_{3s}$ oder $G\beta_{3s2}$ eine Veränderung an Elementen der G-Protein-gekoppelten Signalübertragung beobachtet werden kann. So wurde in Sf9-Zellen gezeigt, dass nach Überexpression von $G\beta_{3s}$ zusammen mit $G\alpha_{i2}$ und $G\gamma_5$ der direkte G-Protein-Aktivator Mastoparan die Zunahme der [35 S] GTP γ S-Bindung stimulieren kann, was ein Maß für die Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit darstellt (Siffert et al., 1998). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass es nach Überexpression von $G\beta_{3s}$ oder $G\beta_{3s2}$ zu einer Aktivierung

der MAP-Kinase-Kaskade kommt (Roskopf et al., 2003) und dass die Migration entsprechend transfizierter Zellen in Anwesenheit von $G\beta_{3s}$ gesteigert ist (Virchow et al., 1998). Andererseits wurde nach Überexpression von $G\beta_{3s}$ oder $G\beta_{3s2}$ im Gegensatz zu $G\beta_3$ keine Aktivierung der Phospholipase $C\beta_2$ beachtet (Roskopf et al., 2003). Diese Ergebnisse belegen, dass $G\beta_{3s}$ bzw. $G\beta_{3s2}$ nicht nur mit $G\gamma$ -Untereinheiten Dimere bilden können, sondern dass diese Dimere sowohl die Aktivierung von $G\alpha$ -Untereinheiten beeinflussen als auch die Aktivität von typischen $G\beta\gamma$ -abhängigen Dimeren – zum Teil selektiv – modulieren können. Auch diese Befunde sprechen dafür, dass $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ trotz ihrer Deletion weitere – in diesem Fall funktionelle – Eigenschaften von $G\beta$ -Proteinen besitzen. Diese Tatsache verleiht den eigenen biochemischen Daten eine erhebliche biologische Plausibilität.

Man darf allerdings nicht vergessen, dass es sich bei diesen Experimenten jeweils um Untersuchungen unter Überexpressionsbedingungen gehandelt hat. Während viel dafür spricht, dass $G\beta_{3s}$ bzw. $G\beta_{3s2}$ enthaltende $G\beta\gamma$ -Dimere auf herkömmlichen Wege mit den $G\alpha$ -Untereinheiten und Effektoren reagieren, kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Überexpression der $G\beta_3$ -Varianten das Gefüge der endogenen G-Proteine in der Art stört, dass es zu den beobachteten Effekten kommt. Tatsächlich muss man berücksichtigen, dass $G\beta_{3s}$ bzw. $G\beta_{3s2}$ enthaltende $G\beta\gamma$ -Dimere in den meisten Fällen mit einer deutlich niedrigeren Effizienz ausgebildet werden als Dimere mit Wildtyp- $G\beta_3$. Berücksichtigt man noch zusätzlich, dass zumindest die Transkriptmengen von $G\beta_{3s}$ bzw. $G\beta_{3s2}$ deutlich unter denen von $G\beta_3$ liegen (Siffert et al., 1998; Roskopf et al., 2003), so ist eher von einer nur geringen $G\beta_{3s}/G\beta_{3s2}$ -Menge bei 825T-Allelträgern auszugehen, einer Menge, die deutlich unter der Menge an Wildtyp- $G\beta_3$ -Protein liegt. Von daher darf man Ergebnisse aus den Überexpressionsexperimenten, bei denen $G\beta_{3s}$ bzw. $G\beta_{3s2}$ jeweils im Übermaß gebildet wurde, nicht uneingeschränkt auf die Situation *in vivo* übertragen.

Für die abschließende Beantwortung solcher Fragen ist es daher notwendig, die genauen Stöchiometrien der $G\beta_3$ -Varianten genotypabhängig auf Proteinebene zu kennen. Reinigung und Rekonstitution von Dimeren der $G\beta_3$ -Varianten mit den verschiedenen $G\gamma$ -Untereinheiten wären erforderlich um zu klären, ob die Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskade oder die geänderte Aktivierbarkeit von $G\alpha$ -Untereinheiten direkte Wirkungen des $G\beta_{3s}\gamma$ - oder des $G\beta_{3s2}\gamma$ -Dimers sind. Diese Untersuchungen stehen noch aus.

Andererseits konnte in *in vitro*-Experimenten nachgewiesen werden, dass sich der *GNB3* C825T-Polymorphismus tatsächlich dafür eignet, zelluläre Phänotypen vorherzusagen. So

zeichnen sich neutrophile Granulozyten von T-Allelträgern durch eine gesteigerte chemotaktische Reaktion auf die Stimulation mit Interleukin-8 aus (Virchow et al., 1998). Daneben ist auch die T-Zell-Immunantwort bei Trägern des 825T-Allels gesteigert (Lindemann et al., 2001) und die Thrombozytenaggregation verstärkt (Naber et al., 2000a). Neben diesen Beispielen, die eine gesteigerte Aktivierung von Signalwegen bei Trägern des 825T-Allels nahe legen, existieren allerdings auch Berichte gegenteiligen Inhalts. So wiesen Ryden et al. (2002) nach, dass die Lipolyse in Fettzellen nach Stimulation α_2 -adrenerger Rezeptoren und nach Stimulation von β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren bei T-Allelträgern abgeschwächt erfolgt. Die Ursachen sind unklar.

Diese Punkte belegen, dass noch viele Fragen zur molekularen Genese des *GNB3* 825T-Phänotyps offen sind. Die hier präsentierten Ergebnisse liefern aber ein erstes Fundament, auf welchem die weitere biochemische Analyse dieser Fragen erfolgen kann.

Genetische Varianten in weit verbreitet vorkommenden Signalproteinen, wie hier der G-Proteinuntereinheit $G\beta_3$, können potentiell zahlreiche physiologische Systeme betreffen. Tatsächlich wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe von Assoziationsstudien veröffentlicht, welche zeigten, dass sich Träger des 825T-Allels von homozygoten Trägern des 825C-Allels deutlich unterscheiden. So wurde gezeigt, dass Träger des 825T-Allels ein erhöhtes Risiko haben, an arteriellem Hypertonus, Adipositas oder Diabetes mellitus zu erkranken (Siffert et al., 1998; Schunkert et al., 1998; Benjafeld et al., 1998; Dong et al., 1999; Hengstenberg et al., 2001, Siffert et al., 1999a; Siffert et al., 1999b; Rosskopf et al., 2000b). Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit erleiden häufiger einen Myokardinfarkt, wenn sie das T-Allel tragen (Naber et al., 2000b) und auch ihre koronare Reaktivität nach Aktivierung des α_2 -Adrenozeptors ist gesteigert (Baumgart et al., 1999). Daneben konnten für einige Arzneimittel genotypabhängige Unterschiede in ihrer Wirksamkeit nachgewiesen werden (Turner et al., 2000; Zill et al., 2000). Andere Assoziationsstudien – z.T. zu den gleichen Fragen – konnten keinen Zusammenhang zwischen dem 825T-Allel und einem klinischen Phänotyp finden (Schunkert et al., 1998; Brand et al., 1999; Snapir et al., 2001). Als Ursachen dieser z.T. widersprüchlichen Ergebnisse kommen möglicherweise Probleme bei der repräsentativen Rekrutierung der Probanden- und Patientengruppen in Frage. Daneben kennt man erhebliche ethnische Unterschiede in der Genotypverteilung des *GNB3* C825T-Polymorphismus. Auch hier sind viele weitere Fragen in der Zukunft zu klären.

Der Fall des *GNB3* C825T-Polymorphismus ist ein Beispiel für die Komplexität der Zusammenhänge zwischen einem einfachen Basenaustausch einerseits und komplexen Änderungen der systemischen Regulation andererseits (z.B. Fettverteilung, Bluthochdruck).

Wie berichtet existieren viele offene Fragen in dieser Kausalkette, die überwiegend auf Assoziationsstudien beruht. Viele mechanistische Überlegungen sind daher noch spekulativ. Die hier vorgestellten Ergebnisse können eine Lücke in der Argumentation schließen, indem der Nachweis der direkten Interaktion von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$ mit den verschiedenen $G\gamma$ -Untereinheiten geführt wurde. Daneben wurden sich ausbildende $G\beta\gamma$ -Spezifitäten in Ansätzen herausgearbeitet. Durch diese Aufklärung der $G\beta_{3s}/G\beta_{3s2}$ - $G\gamma$ -Spezifitäten wurde somit ein wichtiger Schritt getan hin zu einer weiteren molekularen Analyse der Funktion von $G\beta_{3s}$ und $G\beta_{3s2}$, welche die Grundvoraussetzung für ein molekulares Verständnis des komplexen Phänotyps ist, der sich bei Trägern des *GNB3* 825T-Allels manifestiert.

Schließlich wurde in dieser Arbeit erstmalig für alle Permutationen zwischen $G\beta$ -Isoformen der $G\beta_1$ - $G\beta_4$ -Familie und $G\gamma$ -Untereinheiten der Nachweis ihrer direkten Interaktion geführt. Aufbauend auf diesen Experimenten kann zukünftig – z.B. durch Aufreinigung von $G\beta\gamma$ -Dimeren, die ein entsprechendes Epitopmotiv tragen – die weitere biochemische Analyse der $G\beta\gamma$ -Interaktion mit $G\alpha$ -Untereinheiten und Effektoren betrieben werden.

6. Zusammenfassung

G β_{3s} und G β_{3s2} sind Spleißvarianten der G-Proteinuntereinheit G β_3 , die gehäuft in Assoziation mit dem T-Allel eines genetischen Polymorphismus (C825T) im Gen der G-Proteinuntereinheit G β_3 (*GNB3*), auftreten. Eine wichtige Eigenschaft von G β -Untereinheiten ist ihre Fähigkeit, mit G-Protein- γ -Untereinheiten (G γ) stabile Dimere zu bilden, welche eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Spezifitäten bei der Signalübertragung vom Rezeptor zum Effektor spielen.

Gegenstand dieser Arbeit war die Analyse, welche der bekannten zwölf G γ -Untereinheiten mit G β_{3s} und G β_{3s2} dimerisieren können und wie effektiv diese Interaktion geschieht.

Zu diesem Zweck wurden cDNA-Konstrukte der zwölf G γ -Untereinheiten generiert, denen durch Mutagenese unter Verwendung modifizierter Oligonukleotidprimer und der Polymerasekettenreaktion ein N-terminales Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) eingefügt wurde. Nach *in vitro*-Translation und radioaktiver Markierung wurden Mischungen aus G β_1 , G β_2 , G β_3 , G β_{3s} , G β_{3s2} bzw. G β_4 mit G γ_1 , G γ_2 , G γ_3 , G γ_4 , G γ_5 , G γ_7 , G γ_{8cone} , G γ_{10} , G γ_{11} , G γ_{12} bzw. G γ_{13} hergestellt. Mit Hilfe eines gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpers konnten G $\beta\gamma$ -Dimere immunpräzipitiert und nach Autoradiographie dargestellt und quantifiziert werden. Neben diesen *in vitro*-Versuchen wurden einige dieser Kombinationen auch *in vivo* nach Transfektion und metabolischer Markierung von Zellen analysiert.

Für die Wildtypproteine G β_1 , G β_2 , G β_3 und G β_4 konnten immunpräzipitierbare Dimere mit allen untersuchten G γ -Proteinen nachgewiesen werden. Auch für G β_{3s} und G β_{3s2} ließen sich Dimere mit allen G γ -Untereinheiten außer G γ_2 nachweisen. Bezogen auf das Wildtypprotein G β_3 waren für G β_{3s} und G β_{3s2} die Mengen an präzipitierbaren Dimeren mit den farnesylierten G γ -Untereinheiten G γ_1 , G γ_{8cone} und G γ_{11} sowie mit G γ_{13} am größten. Alle anderen G γ -Untereinheiten bildeten mit G β_{3s} und G β_{3s2} eine deutlich geringere Menge präzipitierbarer Dimere als mit G β_3 . Wurden diese Experimente an ganzen Zellen wiederholt, so war der präzipitierbare Anteil von G β_{3s} und G β_{3s2} mit G γ_5 , G γ_{8cone} und G γ_{12} , bezogen auf G β_3 , höher als in den *in vitro*-Translationsexperimenten. Dies spricht für eine effektivere Prozessierung und Dimerisierung von G β_{3s} und G β_{3s2} mit G γ -Proteinen in intakten Zellen.

Zusammengefasst belegen diese Experimente, dass G β_{3s} und G β_{3s2} trotz der Deletion einer gesamten einem Propellerblatt entsprechenden Domäne (WD-Domäne) in der Lage sind, mit G γ -Untereinheiten stabile Dimere zu bilden, ein wichtiges biochemisches Charakteristikum von G β -Proteinen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Grad der Dimerisierung von dem des Wildtypproteins G β_3 abweicht und dass auch veränderte G β -G γ -Spezifitäten bestehen.

7. Literaturverzeichnis

1. Adams, J. W., Heller Brown, J. (2001): G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart. *Oncogene* 20, 1626-1634
2. Arai, H., Tsou, C. L., Charo, I. F. (1997): Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: evidence that directed migration is mediated by $\beta\gamma$ dimers released by activation of $G\alpha_i$ -coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14495-14499
3. Asano, T., Morishita, R., Ohashi, K., Nagahama, M., Miyake, T., Kato, K. (1995): Localisation of various forms of the γ subunit of G protein in neural and nonneural tissues. *J. Neurochem.* 64, 1267-1273
4. Balcueva, E. A., Wang, Q., Hughes, H., Kunsch, C., Yu, Z., Robishaw, J. D. (2000): Human G protein γ_{11} and γ_{14} subtypes define a new functional subclass. *Exp. Cell Res.* 257, 310-319
5. Baumgart, D., Naber, C., Haude, M., Oldenburg, O., Erbel, R., Heusch, G., Siffert, W. (1999): G protein β_3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on α_2 -adrenoceptor activation. *Circ. Res.* 85, 965-969
6. Beckerath von, N., Kastrati, A., Koch, W., Böttiger, C., Mehilli, J., Seyfarth, M., Schömig, A. (1999): G protein β_3 subunit polymorphism and risk of thrombosis and restenosis following coronary stent placement. *Atherosclerosis* 149, 151-155
7. Benjafeld, A. V., Jeyasingham, C. L., Nyholt, D. R., Griffiths, L. R., Morris, B. J. (1998): G protein β_3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 32, 1094-1097
8. Beige, J., Engeli, S., Ringel, J., Offermann, G., Distler, A., Sharma, A. J. (1999): Donor G protein β_3 subunit 825TT genotype is associated with reduced kidney allograft survival. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1717-1721

9. Blake, B. L., Wing, M. R., Zhou, J. Y., Lei, Q., Hillman, J. R., Behe, C. I., Morris, R. A., Harden, T. K., Bayliss, D. A., Miller, R. J., Siderovski, D. P. (2001): G β association and effector interaction selectivities of the divergent G γ subunit G γ_{13} . *J. Biol. Chem.* 276, 49267-49274

10. Bogoyevitch, M. A., Clerk, A., Sudgen, P. H. (1995): Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by pertussis toxin-sensitive and -insensitive pathways in cultured ventricular cardiomyocytes. *Biochem. J.* 309, 437-443

11. Brand, E., Herrmann, S.-M., Nicaud, V., Ruidavets, J.-B., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Plouin, P.-F., Tired, L., Cambien, F. (1999): The 825C/T polymorphism of the G-Protein subunit $\beta 3$ is not related to hypertension. *Hypertension* 33, 1175-1178

12. Burset, M., Seledtsov, I. A., Solovjev, V. V. (2001): Splice DB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. *Nucl. Acid. Res.* 29, 255-259

13. Cali, J. J., Balcueva, E. A., Rybalkin, I., Robishaw, J. D. (1992): Selective tissue distribution of G protein γ subunits, including a new form of the γ subunits identified by cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 267, 24023-24027

14. Clapham, D. E., Neer, E. J. (1997): G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 167-203

15. Dietrich, A., Meister, M., Brazil, D., Camps, M., Gierschik, P. (1994): Stimulation of phospholipase C-beta 2 by recombinant guanine-nucleotide-binding protein beta gamma dimers produced in a baculovirus/insect cell expression system. Requirement of gamma-subunit isoprenylation for stimulation of phospholipase C. *Eur. J. Biochem.* 219, 171-178

16. Dippel, E., Kalkbrenner, F., Wittig, B., Schultz, G. (1996): A heterotrimeric G protein complex couples the muscarinic m1 receptor to phospholipase C-beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1391-1396

17. Dobrev, D., Wettwer, E., Himmel, H. M., Kortner, A., Kuhlisch, E., Schüler, S., Siffert, W., Ravens, U. (2000): G-Protein $\beta 3$ -subunit 825T allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents. *Circulation* 102, 692-697
18. Dong, Y., Zhu, H., Sagnella, G. A., Carter, N. D., Cook, D. G., Cappuccio, F. P. (1999): Association between the C825T polymorphism of the G protein $\beta 3$ -subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension* 34, 1193-1196
19. Farfel, Z., Bourne, H. R., Iiri, T. (1999): The expanding spectrum of G protein diseases. *N. Engl. J. Med.* 340, 1012-1020
20. Fung, B. K.-K., Lieberman, B. S., Lee, R. H. (1992): A third form of the G protein β subunit. *J. Biol. Chem.* 267, 24782-24788
21. Garcia-Higuera, I., Gaitatzes, C., Smith, T. F., Neer, E. J. (1998): Folding a WD propeller. *J. Biol. Chem.* 273, 9041-9049
22. Gautam, N., Downes, G. B., Yan, K., Kisselev, O. (1998): The G protein $\beta\gamma$ complex. *Cell. Signal.* 10, 447-455
23. Gautam, N., Northup, J., Tamir, H., Simon, M. I. (1990): G protein diversity is increased by associations with a variety of γ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7973-7977
24. Guttersohn, A., Naber, C., Müller, N., Erbel, R., Siffert, W. (2000): G protein $\beta 3$ subunit 825TT genotype and post-pregnancy weight retention. *Lancet* 355, 1241-1242
25. Hamm, H.E. (1998): The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 669-672
26. Hengstenberg, Ch., Schunkert, H., Mayer, B., Döring, A., Löwel, H., Hense, H. W., Fischer, M., Riegger, G. A. J., Holmer, S. R. (2001): Association between a polymorphism in the G protein $\beta 3$ subunit gene (*GNB3*) with arterial hypertension but not with myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 49, 820-827

27. Hocher, B., Slowinski, T., Stolze, T., Pleschka, A., Neumayer, H. H., Halle, H. (2000): Association of maternal G protein $\beta 3$ subunit 825 T allele with low birthweight. *Lancet* 355, 1242-1242
28. Huang, L., Shanker, Y. G., Dubauskaite, J., Zheng, J. Z., Yan, W., Rosenzweig, S., Spielman, A. I., Max, M., Margolskee, R. F. (1999): $G\gamma_{13}$ colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP_3 responses to bitter denatonium. *Nat. Neurosci.* 2, 1055-1062
29. Iiri, T., Bourne, H. R. (1998): G proteins propel surprise. *Nat. Genet.* 18, 8-10
30. Ishikawa, K., Imai, Y., Katsuya, T., Ohkubo, T., Tsuji, I., Nagai, K., Takami, S., Nakata, Y., Sazoh, H., Hisamichi, S., Higaki, J., Oghihara, T. (2000): Human G-protein $\beta 3$ subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am. J. Hypertens.* 13, 140-145
31. Jacobi, J., Hilgers, K. F., Schlaich, M. P., Siffert, W., Schmieder, R. E. (1999): 825T allele of the G-protein $\beta 3$ subunit gene (GNB3) is associated with impaired left ventricular diastolic filling in essential hypertension. *J. Hypertens.* 17, 1457-1462
32. Kaplan, N. K. (1994): Clinical hypertension. Williams and Wilkins. Baltimore.
33. Kato, N., Sugiyama, T., Morita, H., Kurihara, H., Yamori, Y., Yazaki, Y. (1998): G protein $\beta 3$ subunit variant and essential hypertension in Japanese. *Hypertension* 32, 935-938
34. Kleuss, C., Scherübl, H., Hescheler, J., Schultz, G., Wittig, B. (1993): Selectivity in signal transduction determined by γ subunits of heterotrimeric G proteins. *Science* 259, 832-834
35. Kozasa, T., Gilman, A. G. (1995): Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. Characterisation of alpha 12 and inhibition of adenyl cyclase by alpha z. *J. Biol. Chem.* 270, 1734-1741

36. Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., Sigler, P. B. (1996): The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 376, 311-319
37. Lee, R. H., Lieberman, B. S., Yamane, H. K., Bok, D., Fung, B. K.-K. (1992): A third form of the G protein β subunit. *J. Biol. Chem.* 267, 24776-24781
38. Lei, Q., Jones, M. B., Talley, E. M., Schrier, A. D., McIntire, W. E., Garrison, J. C., Bayliss, D. A. (2000): Activation and inhibition of G protein coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9771-9776
39. Li, Y., Sternweis, P. M., Smith, T. F., Gilman, A. G., Neer, E. J., Kozasa, T. (1998): Sites important for G α binding on the G protein β subunit overlap with sites for regulation of phospholipase C β and adenyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 273, 16265-16272
40. Lindemann, M., Virchow, S., Ramann, F., Barsegian, V., Kreuzfelder, E., Siffert, W., Müller, N., Grosse-Wilde, H. (2001): The G protein $\beta 3$ subunit 825T allele is a genetic marker for enhanced T cell response. *FEBS Letters* 495, 82-86
41. Mende, U., Schmidt, C. J., Yi, F., Spring, D. J., Neer, E. J. (1995): The G protein γ subunit. *J. Biol. Chem.* 270, 15892-15898
42. Morishita, R., Nakayama, H., Isobe, T., Matsuda, T., Hashimoto, Y., Okano, T., Fukada, Y., Mizuno, K., Ohno, S., Kozawa, O., Kato, K., Asano, T. (1995): Primary structure of a γ subunit of G protein, γ_{12} , and its phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270, 29469-29475
43. Morishita, R., Ueda, H., Kato, K., Asano, T. (1998): Identification of two forms of the γ subunit of G protein, γ_{10} and γ_{11} , in bovine lung and their tissue distribution in the rat. *FEBS Letters* 428, 85-88

44. Morrison, A. C., Doris, P. A., Folsom, A. R., Nieto, F. J., Boerwinkle, E.; for the Atherosclerosis Risk in Communities Study (2001): G protein $\beta 3$ subunit and α -adducin polymorphisms and risk of subclinical and clinical stroke. *Stroke* 34, 822-829
45. Muramoto, S., Murakami, T., Urasawa, K., Kawaguchi, H., Kitabatake, A. (1995): Cytosolic localization of $\beta 3$ subunit of heterotrimeric GTP binding protein in rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 799-804
46. Naber, C., Hermann, B. L., Vietzke, D., Altmann, C., Haude, M., Mann, K., Roskopf, D., Siffert, W. (2000a): Enhanced epinephrine-induced platelet aggregation in individuals carrying the G protein $\beta 3$ subunit 825 T allele. *FEBS Letters* 484, 199-201
47. Naber, C., Hüsing, K. J., Wolfhard, U., Erbel, R., Siffert, W. (2000b): Interaction of the *ACE D* allele and the *GNB3 825T* allele in myocardial infarction. *Hypertension* 36, 986-989
48. Neer, E. J., Lok, J. M., Wolf, L. W. (1984): Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 14222-14229
49. Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., Smith, T. F. (1994): The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, 297-300
50. Neer, E. J. (1995): Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257
51. Neves, S. R., Ram, P. T., Iyengar, R. (2002): G Protein pathways. *Science* 296, 1636-1639
52. Panchenko, M. P., Saxena, K., Li, Y., Charnecki, S., Sternweis, P. M., Smith, T. F., Gilman, A. G., Kozasa, T., Neer, E. J. (1998): Sites important for PLC $\beta 2$ activation by the G protein $\beta\gamma$ subunit to the sides of the β propeller structure. *J. Biol. Chem.* 273, 28298-28304

53. Pietruck, F., Spleiter, S., Daul, A., Philipp, T., Derwahl, M., Schatz, H., Siffert, W. (1998): Enhanced G protein activation in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 41, 94-100
54. Poch, E., González, D., Gómez-Angelats, E., Enjuto, M., Paré, J. C., Rivera, F., de la Sierra, A. (2000): G protein $\beta 3$ subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension* 35, 214-218
55. Pronin, A. N., Gautam, N. (1993): Proper processing of a G Protein γ subunit depends on complex formation with β subunit. *FEBS Letters* 328, 89-93
56. Rahmatullah, M., Ginnan, R., Robishaw, J. D. (1995): Specificity of G protein α - γ subunit interactions. *J. Biol. Chem.* 270, 2946-2951
57. Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L. M., Robishaw, J. D. (1995): Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein γ subunits, including three novel forms designated the γ_4 , γ_{10} and γ_{11} subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 21765-21771
58. Roszkopf, D., Busch, S., Manthey, I., Siffert, W. (2000a): G protein $\beta 3$ gene: Structure, promoter, and additional polymorphisms: *Hypertension* 36, 33-41
59. Roszkopf, D., Frey, U., Eckhardt, S., Schmidt, S., Ritz, E., Hofmann, S., Jaksch, M., Müller, N., Hüsing, J., Siffert, W., Jöckel, K. H. (2000b): Interaction of the G protein beta 3 subunit T825 allele and the IRS-1 Arg972 variant in type 2 diabetes. *Eur. J. Med. Res.* 5, 484-490
60. Roszkopf, D., Manthey, I., Siffert, W. (2002): Identification and ethnic distribution of major haplotypes in the gene *GNB3* encoding the G-protein $\beta 3$ subunit. *Pharmacogenetics* 12, 1-12
61. Roszkopf, D., Manthey, I., Habich, C., Kielbik, M., Eisenhardt, A., Nikula, C., Urban, M., Kohnen, S., Graf, E., Ravens, U., Siffert, W. (2003): Identification and characterisation of G $\beta 3s2$, a novel splice variant of the G-protein $\beta 3$ subunit. *Biochem. J.* 371, 223-232

62. Rydén, M., Faulds, G., Hoffstedt, J., Wennlund, A., Arner, P. (2002): Effect of the (C825T) G β_3 polymorphism on adrenoceptor-mediated lipolysis in human fat cells. *Diabetes* 51, 1601-1608
63. Saxena, K., Gaitatzes, C., Walsh, M. T., Eck, M., Neer, E. J., Smith, T. F. (1996): Analysis of the physical properties and molecular modeling of Sec13: A WD repeat protein involved in vesicular traffic. *Biochemistry* 35, 15215–15221
64. Schäfers, R. F., Nürnberger, J., Rütz, A., Siffert, W., Wenzel, R. R., Mitchell, A., Philipp, T., Michel, M. (2001): Haemodynamic characterization of young normotensive men carrying the 825T-allele of the G-protein β_3 subunit. *Pharmacogenetics* 11, 461-470
65. Schmidt, C. J., Neer, E. J. (1991): *In vitro* synthesis of G protein $\beta\gamma$ dimers. *J. Biol. Chem.* 266, 4538- 4544
66. Schmidt, C. J., Thomas, T. C., Levine, M. A., Neer, E. J. (1992): Specificity of G protein β and γ subunit interactions. *J. Biol. Chem.* 267, 13807-13810
67. Schunkert, H., Hense, H.-W., Döring, A., Riegger, G. A. J., Siffert, W. (1998): Association between a polymorphism in the G protein β_3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension* 32, 510-513
68. Semplicini, A., Siffert, W., Sartori, M., Monari, A., Naber, C., Frigo, G., Santonastaso, M., Cozzutti, E., Winnicki, M., Palatini, P. (2001): G protein β_3 subunit gene 825T allele is associated with increased left ventricular mass in young subjects with mild hypertension. *Am. J. Hypertens.* 14, 1191-1195
69. Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A. M., Ritz, E., Wichmann, H.-E., Jakobs, K. H., Horsthemke, B. (1998): Association of a G protein β_3 subunit variant with hypertension. *Nat. Genet.* 18, 45-49

70. Siffert, W., Naber, C., Walla, M., Ritz, E. (1999a): G protein $\beta 3$ subunit 825 T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals. *J. Hypertens.* 17, 1095-1098
71. Siffert, W., Forster, P., Jöckel, K.-H., Mvere, D. A., Brinkmann, B., Naber, C., Crookes, R., Heyns, A. du P., Epplen, J. T., Fridey, J., Freedman, B. I., Müller, N., Stolke, D., Sharma, A. M., Al Moutaery, K., Grosse-Wilde, H., Buerbaum, B., Ehrlich, T., Razi Ahmad, H., Hortshemke, B., Du Toit, E. D., Tilikainen, A., Ge, J., Wang, Y., Yang, D., Hüsing, J., Rosskopf, D. (1999b): Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825 T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1921–1930
72. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85
73. Snapir, A., Heinonen, P., Tuomainen, T. P., Lakka, T. A., Kauhanen, J., Salonen, J. T., Scheinin, M. (2001): G-protein $\beta 3$ subunit C825T polymorphism: no association with risk for hypertension and obesity. *J. Hypertens.* 19, 2149-2155
74. Sprague, E. R., Redd, M. J., Johnson, A. D., Wolberger, C. (2000): Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *EMBO J.* 19, 3016- 3027
75. Spring, D. J., Neer, E. J. (1994): A 14-amino acid region of the G protein γ subunit is sufficient to confer selectivity of γ binding to the β subunit. *J. Biol. Chem.* 269, 22882-22886
76. Stallings-Mann, M. L., Ludwiczak, R. L., Klinger, K. W., Rottman, F. (1996): Alternative splicing of exon 3 on the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12394-12399
77. Tabara, Y., Kohara, K., Miki, T. (2002): Polymorphisms of genes encoding components of the sympathetic nervous system but not the renin-angiotensin system as risk factors for orthostatic hypotension. *J. Hypertens.* 20, 651-656

78. Thomas, T. C., Sladek, T., Yi, F., Smith, T., Neer, E. J. (1993): G protein $\beta\gamma$ subunit: Physical and chemical characterisation. *Biochemistry* 32, 8628-8635
79. Tseng, H., Peterson, T. E., Berk, B. C. (1995): Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ. Res.* 77, 869-878
80. Turner, S. T., Schwartz, G. L., Chapman, A. B., Boerwinkle, E. (2001): C825T polymorphism of the G protein $\beta 3$ -subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 37, 739-743
81. Virchow, S., Ansorge, N., Roszkopf, D., Rübber, H., Siffert, G., Siffert, W. (1998): Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein $\beta 3$ subunit 825 T-allele. *FEBS Letters* 436, 155-158
82. Virchow, S., Ansorge, N., Roszkopf, D., Rübber, H., Siffert, W. (1999): The G protein $\beta 3$ subunit splice variant G $\beta 3$ -s causes enhanced chemotaxis of human neutrophils in response to interleukin-8. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 360, 27-32
83. Weizsäcker von, E., Strathmann, M. P., Simon, M. I. (1992): Diversity among the beta subunits of heterotrimeric GTP-binding proteins: characterisation of a novel beta-subunit cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 350-356
84. Yan, K., Kalyanaraman, V., Gautam, N. (1996): Differential ability to form the G protein $\beta\gamma$ complex among members of the β and γ subunit families. *J. Biol. Chem.* 271, 7141-7146
85. Zeltner, R., Delles, C., Schneider, M., Siffert, W., Schmieder R. E. (2001): G protein $\beta 3$ subunit gene (*GNB3*) 825T allele is associated with enhanced renal perfusion in early hypertension. *Hypertension* 37, 882-886

8. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosin-5`-diphosphat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosin-5`-monophosphat
(k)Da	(Kilo-) Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	2`-Desoxy-adenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxy-cytidin-5`-triphosphat
dGTP	2`-Desoxy-guanosin-5`-triphosphat
dNTP	2`-Desoxy-nukleosid-5`-triphosphat
dTTP	2`-Desoxy-thymidin-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G α , G β bzw. G γ	α -, β - bzw. γ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
GDP	Guanosin-5`-diphosphat
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde
H ₂ O	destilliertes Wasser
IgG	Immunglobulin der Klasse G
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PTX	Pertussistoxin

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Taq</i> Polymerase	DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris-buffered salt solution</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dieter Rosskopf danken, der diese Doktorarbeit von Anfang an betreut hat und der mir sowohl in der experimentellen Phase als auch beim Schreiben der Arbeit stets durch gute Anregungen und Diskussionen hilfreich war. Er hat mich immer wieder dazu ermutigt meinen Fähigkeiten zu vertrauen und hat bei mir das Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. W. Siffert, dessen lebendiges Interesse an neuen Ergebnissen, vor allem in der Phase der Immunpräzipitationsversuche, meine Motivation oftmals neu gestärkt hat.

Von den Mitarbeiterinnen des Instituts möchte ich mich bei Iris, Birgit und Gerlinde für ihre stete Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bedanken. Iris war mir eine gute Lehrerin für alle Laborarbeiten; besonders wichtig ist hierbei für mich, dass sie mir den verantwortungsvollen Umgang mit radioaktiven Stoffen beigebracht hat.

Auch meine Mitdotorandinnen Marzena und Sergül seien hier genannt: Mit ihnen zusammen zu arbeiten, hat mir jeden Tag aufs Neue Freude bereitet. Hüseyin bin ich zu großem Dank verpflichtet, weil er mich in der Frühphase meiner Tätigkeit im Institut immer wieder ermutigt hat.

Unaussprechlicher Dank gebührt meinem Ehemann Armin, der mich in allen Phasen der Arbeit unterstützt hat und mir immer mit liebevollem Verständnis zur Seite stand.

Lebenslauf

Name	Christiane Maria Nikula, geb. Beuse
Geburtsdatum	16.06.1976
Geburtsort	Herford
Wohnort	Düsseldorf

Schulbildung

1982 – 1986	Grundschule
1986 – 1995	Friedrichsgymnasium zu Herford

Medizinstudium

10/1995 – 09/1998	Medizinische Hochschule Hannover
10/1998 – 11/2002	Universitätsklinikum Essen
ab 09/1999	Dissertation am Institut für Pharmakologie
11/2002	Ärztliche Prüfung

Berufliche Tätigkeit

03/2003 – 06/2003	Ärztin im Praktikum in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Essen
11/2003 – 09/2004	Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin am Evangelischen Krankenhaus Oberhausen
01/2005	Geburt des ersten Kindes Sebastian